

**Aislamiento, selección y evaluación de microorganismos controladores
biológicos de *Botrytis sp.***

Tesis Presentada Para Obtener El Título De

Ingeniero Ambiental

Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD, Bogotá

Orlando Emilio Velásquez Prieto.

Octubre de 2018.

Agradecimientos

Agradezco la UNAD y cada uno de los profesores que aportaron su granito de arena, impartiendo sus conocimientos. Agradezco al director del proyecto, profesor Carlos Andrés Fajardo. Agradezco a la Universidad Santo Tomás y el profesor Paulo Germán García, por su contribución en el desarrollo del proyecto. Agradezco a mi madre por sus enseñanzas y valores inculcados, a mis hermanos por su apoyo y a todas las personas que contribuyeron de una u otra manera para culminar esta etapa de mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
JUSTIFICACIÓN	6
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MARCO CONCEPTUAL	9
MARCO TEÓRICO	14
CONTROL BIOLÓGICO	14
Historia del control biológico	14
¿Qué es el control biológico?	15
Sistemas biológicos reportados	17
PLAGUICIDAS Y SU IMPACTO	19
Los plaguicidas	19
Marco legal	21
Impactos generados por el uso de plaguicidas	21
PATÓGENO A CONTROLAR	23

	IV
Hongos fitopatógenos	23
Botrytis cinérea	26
Impactos en la agricultura, causados por el hongo Botrytis cinérea	28
BACTERIAS HALÓFILAS	30
METODOLOGÍA	32
ÁREA DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS	32
Área de estudio	32
Toma de muestras	33
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS MUESTRAS	34
ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS HALÓFILOS Y HALOTOLERANTES CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTAGÓNICA.	34
Medios de cultivo utilizados	34
Enriquecimiento	35
Aislamiento	35
Caracterización	38
Análisis del grado de halofilicidad	38
ENSAYOS DE EVALUACIÓN ANTAGÓNICA DE LOS MICROORGANISMOS	39
Ensayo in vitro	39
Ensayo in planta	41

	V
ANÁLISIS DE RESULTADOS	42
TOMA DE MUESTRAS	42
Caracterización fisicoquímica de las muestras	42
AISLAMIENTO DE BACTERIAS	43
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS BACTERIAS AISLADAS	45
ANÁLISIS DEL GRADO DE HALOFILICIDAD	47
ENSAYO DE LA CAPACIDAD ANTAGONICA DE LAS BACTERIAS HALLADAS	50
Ensayo in vitro	50
Diámetro de colonia de B. cinérea en presencia de 5 aislamientos de bacterias.	56
IDENTIFICACION MOLECULAR	57
ENSAYO DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE LAS BACTERIAS HALLADAS	59
Prueba de antagonismo en fresas	59
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	74
ANEXO 1. MARCO LEGAL SOBRE PLAGUICIDAS	74
ANEXO 2. ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS DEL AGUA	79
Análisis de agua Choachí	79

Análisis de agua Tabio	81
ANEXO 3. ANÁLISIS MOLECULAR CORPOGEN	83

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1. Fusarium wilt en tomate	24
Imagen 2. Ciclo de vida del Fusarium solani	25
Imagen 3. Ciclo de vida del Botrytis cinérea en viñedos (Fuente: (Elad, Williamson, Tudzynski, & Delen, 2007))	26
Imagen 4. Botrytis cinérea en uva (Fuente: (UdeSantiago al día - Universidad de Santiago de Chile, 2015))	27
Imagen 5. Puntos de muestreo (Google Earth)	32
Imagen 6. Izquierda: termómetro de punzón TECNIK. Derecha: Equipo de medición multiparámetro Cobra 4 Mobile – Link (pH)	33
Imagen 7. Aislamiento y siembra de microorganismos con posible capacidad antagónica de Botrytis sp.	36
Imagen 8. Crecimiento de colonias	37
Imagen 9. Colonias aisladas	37
Imagen 10. Caracterización morfológica de bacterias (Fuente: (Villarreal Sánchez, 2013))	38
Imagen 11. Ensayo in vitro de la capacidad antagónica de los microorganismos de acuerdo a la metodología de (Santiago, Huiliñir, Cottet, & Castillo, 2016)	40
Imagen 12. Ensayo de enfrentamiento dual	40
Imagen 13. Ensayo en fresas	41
Imagen 14. Toma de muestras	42

Imagen 15. Enriquecimiento de las muestras	43
Imagen 16. Primeros resultados aislamiento de bacterias	44
Imagen 17. Resultados parciales antagonismo	50
Imagen 18. Cubrimiento del medio de cultivo por el hongo <i>Botrytis cinérea</i>	52
Imagen 19. A: Control (invadido por <i>Botrytis</i>); B: Cepa CH1; C: Cepa TB3; D: Crecimiento de cepas CH1, CH2 y G1	52
Imagen 20. Crecimiento del hongo <i>Botrytis cinérea</i> en caja de Petri control (sin tratamiento)	56
Imagen 21. Ensayo de capacidad antagónica en fresas	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. <i>Organismos usados para el control biológico</i>	17
Tabla 2 <i>Clasificación taxonómica del hongo Botrytis cinérea</i>	26
Tabla 3 <i>Clasificación de los microorganismos halófilos de acuerdo a sus requerimientos de NaCl</i>	30
Tabla 4 <i>Medio de cultivo LB (Caldo de Luria Bertani)</i>	34
Tabla 5 <i>Medio de cultivo Básico</i>	34
Tabla 6 <i>Metodología de medio de cultivo MEA</i>	35
Tabla 7 <i>Caracterización macroscópica de Bacterias que presentaron antagonismo.</i>	46
Tabla 8 <i>Caracterización microscópica de bacterias que presentaron antagonismo.</i>	46
Tabla 9 <i>Análisis fotométrico de absorbancia de las bacterias que presentaron mejor actividad antagónica.</i>	47
Tabla 10. <i>Identificación género y especie de las bacterias con mayor poder antagonista</i>	58
Tabla 11 <i>Marco legal sobre plaguicidas</i>	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 <i>Absorbancia con diferentes concentraciones de NaCl a 24 horas</i>	48
Gráfico 2 <i>Área bajo la curva del progreso del crecimiento de B. cinérea (ABCPC) en medio de cultivo MEA en presencia de 5 aislamientos de bacterias procedentes de manantiales termales. Las columnas que presentan las mismas letras no presentan diferencias significativa LSD ($p \leq 0.05$)</i>	55
Gráfico 3 <i>Diámetro de colonia de B. cinérea a través del tiempo en medio de cultivo agar MEA en presencia de cinco bacterias procedentes de manantiales termales.</i>	56

INTRODUCCIÓN

Es de gran importancia la implementación de estrategias de control biológico a enfermedades en la agricultura, que permitan disminuir los impactos a la salud y al medio ambiente que se han generado por el uso de inhibidores químicos. Según (Layton *et al.*, 2011) se consideran medios de control biológico al conjunto de reacciones metabólicas, bioquímicas, mecánicas y/o físicas, que de manera natural se desarrollan articulada o individualmente y desencadenan la inhibición de la expresión de un microorganismo patógeno por parte de otro en un ambiente determinado con el fin de lograr la eliminación parcial o total de este sin emplear agentes químicos que causen efectos adversos.

En un trabajo elaborado por Cook y Baker (1983) y citado por (Corrales *et al.*, 2012) se define el control biológico como la reducción de la densidad del inóculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, por uno o más organismos, en forma natural a través de la manipulación del medio ambiente, hospedero o antagonista, logrando de este modo un cultivo sano con mínimas pérdidas para el agricultor. De igual manera y citando al mismo autor, existe un grupo importante de bacterias que presentan efectos antagónicos contra otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. Las bacterias son parte de las cadenas alimenticias del suelo, sirviendo de alimento a otros microorganismos como protozoarios, los cuales pueden ser antagonistas de organismos fitopatógenos.

Para el desarrollo del proyecto de control biológico se pretende encontrar bacterias halófilas que tengan la capacidad antagonista para *Botrytis sp.*, estas bacterias son microorganismos que se pueden encontrar en ambientes extremos y pueden ser tolerantes a diferentes concentraciones

de sal, o incluso pueden necesitarla para su supervivencia. Estos microorganismos se pueden dividir en halófilos débiles, extremos o moderados, estos últimos tienen diferentes usos en la biotecnología y en el laboratorio son fáciles de cultivar, son de requerimientos nutricionales bajos y pueden usar diferentes compuestos como única fuente de carbono y energía (Ramírez, Sandoval, & Serrano, 2004).

Durante el desarrollo del proyecto se tomaron muestras de aguas termales ubicadas en el departamento de Cundinamarca, en los municipios de Guasca, Choachí y Tabio, donde posteriormente se llevó una parte de la muestra a laboratorios especializados para los respectivos análisis fisicoquímicos y la otra parte al laboratorio de la universidad para iniciar el aislamiento, cultivo y selección de las posibles bacterias con la capacidad antagónica en *Botrytis sp.* Una vez aisladas y caracterizadas las bacterias, con estas mismas, se iniciaron los ensayos del antagonismo para el hongo *Botrytis cinérea*, en los cuales se pretendía encontrar los microorganismos que ayudaran en la implementación de un control biológico como sustituto a los plaguicidas de síntesis química y así reducir los efectos ambientales causados por estos últimos y minimizar las pérdidas ocasionadas por dicho patógeno en los diferentes cultivos que ataca.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de fungicidas es sin duda el componente más importante de los programas de manejo de plagas y enfermedades en los sistemas de producción agrícola. Esto se debe a que las enfermedades fúngicas, tienen el potencial de destruir cultivos hasta el punto que los hacen insalvables. Sin embargo, la mayoría de las enfermedades fúngicas son difíciles de erradicar ya que, a pesar de los intentos de erradicación, los brotes de enfermedades pueden continuar ocurriendo a lo largo de varias temporadas de crecimiento, a menudo originadas por esporas que han permanecido inactivas. (McConnell *et al.*, 2003).

A través del tiempo se ha venido indagando acerca de los efectos que tiene el uso de plaguicidas químicos sobre los ecosistemas con los que entra en contacto. Se ha encontrado que la aplicación de los mismos, conlleva riesgos ambientales potenciales debido a la complejidad y toxicidad de sus moléculas. Frecuentemente son compuestos recalcitrantes, cuya degradación lleva mucho tiempo facilitándose así su transporte y permanencia, tanto en el suelo como en los ecosistemas acuáticos. (Corrales *et al.*, 2012).

Ha ocurrido una evolución continua de nuevos compuestos fungicidas en una carrera para superar la resistencia que se genera por su uso desmedido; mejorar su efectividad y reducir las tasas de aplicación. Por ejemplo, en los últimos años, el uso de insecticidas organofosforados se ha restringido en los EE. UU. Debido a la presencia de altas concentraciones en algunas vías fluviales. Posteriormente, el uso de piretroides sintéticos ha aumentado, y estos a su vez están presentando un problema de contaminación de sedimentos (Banks *et al.*, 2005, Weston *et al.*, 2004), citado por (Wightwick, Walters, Allinson, Reichman, & Menzies, 2010). Este es un

ejemplo de los cambios bien intencionados en el uso de agroquímicos que han llevado a una transferencia de riesgos, más que a la reducción de los riesgos.

El hongo fitopatógeno *Botrytis cinérea*, también conocido como moho gris o pudrición gris, es uno de los hongos patógenos más comunes, ya que tiene la capacidad de infectar más de 200 distintas plantas huéspedes. Además de ser un patógeno agresivo, *Botrytis cinérea* es un organismo versátil, capaz de crecer y reproducirse en tejidos dañados, senescentes y muertos de las plantas, se reproduce principalmente por medio de esporas asexuales, o conidios. (Bolda & T. Koike, 2016).

El manejo convencional de los problemas fitosanitarios por parte de los agricultores se basa en la aplicación de productos químicos, que generan deterioro en los suelos y disminuyen la calidad del producto agrícola. Razón por la cual en los últimos años las investigaciones están encaminadas a plantear sistemas de control de fitopatógenos, usando biocontroladores como alternativa para mantener el equilibrio en los ecosistemas agrícolas. Sin embargo, siendo un tema reciente, aun falta invertir esfuerzos en la búsqueda de estrategias biológicas para el control de este tipo de plagas.

De acuerdo a lo anterior, uno de los ataques más frecuente en los cultivos de fruta es el generado por el hongo *Botrytis cinérea*, que ha llegado a causar enormes pérdidas económicas, lo cual hace que los agricultores apliquen productos químicos para evitar estas pérdidas. Esto lleva a pensar en la posibilidad de buscar alternativas para el control de este hongo, como por ejemplo la utilización de microorganismos de tipo bacteriano y levaduras que ayuden a mantener el equilibrio del ecosistema y no generen contaminación ni problemas a la salud. En el caso del

presente estudio se busca un enfoque hacia bacterias termoresistentes presentes en las aguas termales.

Dentro de este contexto y teniendo en cuenta la necesidad de reemplazar los fungicidas químicos por componentes biológicos que ejerzan el mismo control con un menor impacto ambiental, se planteó la siguiente pregunta de investigación ¿Es posible encontrar microorganismos en las aguas termales con capacidad antagónica contra *Botrytis sp.*, para su control biológico?

JUSTIFICACIÓN

El hongo *Botrytis cinérea* es el principal causante de la pudrición en diferentes cultivos frutales, puede aparecer en cualquier momento del ciclo de cultivo, aunque principalmente ataca los frutos. Esta enfermedad conlleva importantes pérdidas económicas que puede no solo presentarse durante el periodo de cultivo sino también después de la cosecha, durante el almacenamiento y el transporte (Fernández D. , 2017), asimismo este hongo puede permanecer en el suelo sin manifestarse por periodos largos de tiempo, hasta que las condiciones ambientales, la posible resistencia a un control químico usado, un inadecuado control o simplemente un descuido del agricultor, le permita su desarrollo nuevamente en el cultivo.

Se escogió el cultivo de fresa como modelo biológico para evaluar la posibilidad de controlar la proliferación de este hongo fitopatógeno por medio de sistemas biológicos ya que es un fruto de fácil afectación por parte de este hongo; aunque el estudio se puede extender a cualquier otro cultivo que se vea afectado por la *Botrytis cinérea*.

En la sociedad actual y debido a la gran demanda de productos alimenticios para satisfacer las necesidades de la población, se ha desarrollado una agricultura intensiva, donde uno de los objetivos más importantes es la producción a gran escala. Sin embargo, se presentan algunas condiciones adversas como los son varios tipos de plagas que afectan los cultivos. La solución más evidente a esta complicación es la aplicación de plaguicidas de origen químico que pueden llegar a afectar la salud humana, los ecosistemas cercanos y la fauna, afectando la correcta disponibilidad de algunos servicios ecosistémicos importantes.

La implementación y aplicación de agentes de control biológico de plagas adquiere una importancia relevante como alternativa en el desarrollo de una agricultura sostenible que preserve los recursos naturales y el ambiente para las futuras generaciones (Soto Deza, López Medina, & Murguía Reyes, 2012).

Existen varios métodos y agentes biológicos para el control de las plagas y entre estos se pueden encontrar bacterias, hongos e insectos, los cuales están naturalmente presentes en el ambiente, pero debido a la acción del hombre se ha alterado alguno de los componentes, modificando así el equilibrio del entorno. Lo que pretende el control biológico es, mediante la aplicación de uno de estos agentes, actuar sobre un organismo que es considerado como una plaga, dando así nuevamente un equilibrio en el ecosistema.

Dentro de los agentes biológicos se encuentran las bacterias halófilas de los cuales se han encontrado resultados positivos en el control de infecciones fúngicas, como el realizado por (Essghaier, *et al*, 2009), donde se suprimió o redujo la enfermedad *Botrytis cinérea* en fresas mediante halófilos moderados. Estos microorganismos soportan diferentes tipos de concentración de sales y durante el desarrollo del proyecto de control biológico se pretendió encontrar bacterias halófilas que tuvieran la capacidad antagonista para *Botrytis sp.*, las cuales debido a sus bajos requerimientos nutricionales y facilidad de cultivar, pueden arrojar óptimos resultados en el control biológico de este hongo fitopatógeno y así reducir o eliminar el uso de fungicidas de origen químico, minimizando de esta manera los efectos negativos causados en el ambiente, por el control químico de plagas durante más de medio siglo.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Evaluar microorganismos halófilos y halotolerantes con alto potencial antagonista en *Botrytis* *sp.*, procedentes de manantiales termales ubicados en los municipios de Choachí, Guasca y Tabio, en el Departamento de Cundinamarca, que será experimentado en fresa comercial.

Objetivos específicos

- Obtener microorganismos halófilos y halotolerantes a partir de muestras de acuíferos termales.
- Evaluar la capacidad antagónica de los microorganismos hallados en las aguas termales para el control biológico del hongo causante de la pudrición gris (*Botrytis cinérea*).
- Caracterizar e identificar los microorganismos seleccionados.

MARCO CONCEPTUAL

Antagonismo: Este término define dos acciones o procesos que tienen efectos opuestos. Si se producen de forma simultánea, uno va a anular, frenar o atenuar los efectos del otro (CCM Salud, 2013).

La (Real Academia Española, 2017) define el antagonismo biológico como la interacción entre organismos o sustancias que causan la pérdida de actividad de uno de ellos, como por ejemplo la acción de los antibióticos frente a las bacterias.

Biocontrol o control biológico: Es el control de plagas y enfermedades usando enemigos naturales. Dentro del control biológico se distinguen tres grupos de organismos benéficos: los predadores (*ácaros depredadores, chinche, escarabajos y mosquitos*), los parásitos (*avispa parásita y moscas parásitas*) y los microorganismos (*nematodos, hongos, bacterias y virus*) (Koppert - Biological Systems)

Bioplaguicidas: Son derivados de materiales naturales como animales, plantas, microorganismos y minerales, son altamente específicos contra las plagas objetivo y generalmente representan poco o ningún riesgo para las personas ni causa daños graves al ambiente o empeora la contaminación del medio ambiente. Los bioplaguicidas se dividen en dos grandes grupos: agentes o plaguicidas microbianos y agentes o plaguicidas bioquímicos (Nava Pérez, García Gutiérrez, Camacho Báez, & Vázquez Montoya, 2012).

Botrytis cinérea: El nombre *Botrytis cinérea* deriva del griego 'botrys', que significa 'racimo de uvas', y del latín 'cinérea', que hace referencia al color cenizo del moho. Con un microscopio se puede observar que las estructuras que albergan las esporas de los hongos parecen ciertamente

un puñado de uvas. *Botrytis cinérea* es un hongo necrótrofo, lo cual implica que produce la muerte a su anfitrión para obtener todos los nutrientes que necesita. El tejido donde se desarrolla se oscurece y, en ocasiones, también se ablanda debido a la muerte de las células del anfitrión. Transcurrido un tiempo aparecerá una capa de moho gris en las zonas oscurecidas, y el hongo continuará alimentándose de las células debilitadas o muertas, aunque también pueda llegar a afectar a las vivas (una infección de *Botrytis* no se hará visible, por norma general, hasta pasadas dos o tres semanas desde que comenzó). Si la infección puede observarse a simple vista, significa que el moho ya habrá penetrado la planta y no tendrá sentido utilizar un fungicida.

Su nombre, moho gris, hace referencia a una fase del desarrollo del hongo durante la cual adquiere apariencia de pelusa gris. Esta pelusa contiene las esporas (células reproductivas) del hongo, pero no se suele ver frecuentemente porque *Botrytis* requiere de unas condiciones determinadas para producir dichas esporas (García).

Cepa bacteriana: Organismo que presenta un fenotipo característico reproducible de una generación a la otra (Universidad Nacional Autónoma de México - Departamento de Microbiología y Parasitología, 2016).

Según la (Real Academia Española, 2017) una cepa es un grupo de bacterias, cuya ascendencia común es conocida.

La (Real Academia de Ingeniería) define la cepa bacteriana como un cultivo puro de bacterias ya caracterizadas compuesto por la descendencia de un único individuo y, por tanto, con una dotación genética similar.

Espectrofotómetro: **1.** Instrumento usado en el análisis químico que sirve para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiaciones y la concentración o reacciones químicas que se miden en una muestra. También es utilizado en los laboratorios para la cuantificación de sustancias y microorganismos. **2.** Aparato que mide la absorción, transmisión o reflectancia de la luz en función de la longitud de onda. Permite el análisis exacto del color en disolución o sobre un sustrato textil (Real Academia de Ingeniería).

Fitopatógeno: Agentes bióticos que causan enfermedades a las plantas y que pueden ser bacterias, virus, hongos o nematodos, de los cuales los hongos (unas ocho mil especies) son los principales microorganismos causantes de enfermedades a las plantas (Cuervo Usán, Espadas Reséndiz, & Zita Padilla)

Fungicida: Es un compuesto químico u organismo biológico usado para eliminar o inhibir hongos o esporas de estos, ya que los hongos pueden causar graves daños en la agricultura, ocasionando enormes pérdidas de rendimiento, calidad y rentabilidad. Los fungicidas se utilizan tanto en la agricultura como para luchar contra las infecciones por hongos en animales (Agustin, 2011).

Halófilo: Etimológicamente proviene del griego ‘hals’ (sal) y ‘phil’ (afín), lo que significaría ‘que tiene afinidad por la sal’. Este tipo de organismos viven en ambientes hipersalinos y se pueden clasificar en *Halófilos débiles* 1.0 – 5.0, *Halófilos moderados* 5.0 – 15, *Halófilos extremos* 15 -30 y *Halotolerantes* 0 – 5.0, de acuerdo a los requerimientos de sal (NaCl) para su supervivencia.

Los microorganismos halófilos requieren de una concentración salina específica para poder crecer y son dependientes de la concentración de nutrientes que se encuentren en el medio,¹⁴ dentro de los microorganismos procariotas halófilos se encuentran bacterias y arqueas, los cuales han sido objeto de varios estudios taxonómicos y bioprospectivos (Garzón Rubiano, 2016).

Halotolerante: Son microorganismos capaces de vivir tanto en ausencia como en presencia de sales, habitan en ambientes salinos de diversas zonas geográficas cuya composición iónica es variable. Las bacterias halotolerantes poseen múltiples aplicaciones biotecnológicas en la producción de enzimas, aminoácidos y exopolisacáridos, entre otros. Sin embargo, la producción de enzimas es el área más promisorio de todas, pues estas bacterias poseen características como estabilidad a altas concentraciones Salinas, versatilidad de uso y bajo riesgo de contaminación durante su cultivo, favoreciendo su escalamiento a nivel industrial (Flores Fernández, Zavaleta, & Chávez Hidalgo, 2010).

Inhibición: Del verbo inhibir y derivado del latín ‘inhibere’, que significa suspender o impedir (Deconceptos.com)

La (Real Academia Española, 2017) lo define como un componente de sistemas de regulación, psicológicos o fisiológicos, que actúan en los seres vivos. Pueden participar a distintos niveles, por ejemplo, en el sistema nervioso, génico, enzimático, etc. .

MEA: Medio de cultivo compuesto por extracto de malta y agar – agar (Santiago, Huiliñir, Cottet, & Castillo, 2016)

Patógeno: Todo agente biológico externo que se aloja en un ente biológico determinado, dañando de alguna manera su anatomía, a partir de enfermedades o daños visibles o no. A este

ente biológico que aloja a un agente patógeno se lo denomina huésped, hospedador o también hospedante, en cuanto es quien recibe al ente patógeno y lo alberga en su cuerpo (Editorial Definición MX, 2013)

Plaguicida: Sustancia utilizada en agricultura para combatir y eliminar plagas, compuesto de una materia activa, responsable de la acción tóxica específica, un material inerte como medio de soporte y aditivos para aumentar su acción (Real Academia de Ingeniería)

MARCO TEÓRICO

Control biológico

Historia del control biológico

Los primeros indicios de control biológico que se tienen, datan del siglo III D.C., realizados en China mediante la aplicación de hormigas para el control de la cochinilla en los mandarinos, mucho tiempo después, en el año 1602 se observó el parasitismo de una avispa del género *Apanteles* (Hymenoptera: Braconidae) en la mariposa de la col, de la cual se tuvo una interpretación correcta hasta 1706. No fue hasta el siglo XIX que se comprendió el potencial del control biológico de plagas, cuando a finales de este siglo en California se obtuvieron resultados exitosos al introducir la mariquita *Rodalia cardinalis* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae) proveniente de Australia, para el control de la cochinilla acanalada *Icerya purchasi* (Maskell) (Homoptera: Margarodidae) la cual fue introducida accidentalmente desde Australia convirtiéndose en una plaga devastadora para los cítricos en los años 1880s. Casi medio siglo después, en los años 1940s se redujo la aplicación del control biológico debido al uso extensivo de plaguicidas de síntesis, volviendo a tomar importancia en 1962 gracias a una publicación de Rachel Carlson en Estados Unidos sobre los problemas ambientales producidos por el abuso de los plaguicidas (Viñuela, 2005).

En el caso colombiano como a nivel mundial, el control biológico de insectos es el tema con mayor interés en investigación, sin embargo en la década de los 70s es cuando se inició el uso de microorganismos como el baculovirus para el control de *Tricoplusia ni* y *Heliothis spp.*, en el algodón. Hacia el año 1982 se comenzó la producción de diferentes cepas de *Trichoderma spp.*,

para el control del *Fusarium oxysporum* en el clavel. En los años 90 Cenicafe promovió la producción de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) y esto llevó al desarrollo de bioplaguicidas, del control microbiano y estrategias de investigación integral a partir de 1994, lo que también ha permitido el registro de productos de alta calidad para el control biológico (Cotes, 2014).

¿Qué es el control biológico?

El control biológico consiste en la lucha contra plagas y enfermedades de los cultivos de una forma ambientalmente amigable, disminuyendo los efectos negativos en el entorno de la extensión agrícola. Este tipo de control de plagas y enfermedades en los cultivos cada vez toma más fuerza debido a la concientización de los agricultores, partiendo de los enormes daños producidos por el control químico, el cual aparte de disminuir la biodiversidad genera resistencias por parte de la plaga, teniendo que aplicar una mayor cantidad de producto químico, aumentando así los efectos negativos en el ambiente.

En el control biológico de plagas intervienen diferentes agentes, tales como depredadores, bacterias, hongos y virus, entre otros y de los cuales las bacterias tienen un papel importante en el control de hongos fitopatógenos como el caso de estudio. Estos organismos a diferencia de los plaguicidas de origen químico, no representan un mayor riesgo para el medio ambiente y la salud humana, lo que permite una aplicación más segura para la eliminación de la plaga o la reducción de su población, esto último siendo lo adecuado para mantener un equilibrio en el ecosistema, ya que al eliminar por completo una plaga, el enemigo natural de ésta puede desaparecer, permitiendo el regreso posterior de la plaga y cuantiosas pérdidas económicas por los daños causados (Nicholls Estrada, 2008)

Cook y Baker (1983) citado por (Corrales *et al.*, 2012) define el control biológico como la reducción de la densidad del inóculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, por uno o más organismos, en forma natural a través de la manipulación del medio ambiente, hospedero o antagonista. Logrando de este modo un cultivo sano con mínimas pérdidas para el agricultor y menor afectación al medio ambiente. De igual manera y citando al mismo autor, existe un grupo importante de bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. Las bacterias son parte de las cadenas alimenticias del suelo, sirviendo de alimento a otros microorganismos como protozoarios, los cuales pueden ser antagonistas de organismos fitopatógenos.

Es de gran importancia crear la implementación de estrategias de control biológico de enfermedades en la agricultura, que permita disminuir los impactos de salud y ambiental que se ha generado por el uso de inhibidores químicos. Según (Layton *et al.*, 2011) se consideran medios de control biológico al conjunto de reacciones metabólicas, bioquímicas, mecánicas y/o físicas, que de manera natural se desarrollan articulada o individualmente y desencadenan la inhibición de la expresión de un microorganismo patógeno por parte de otro en un ambiente determinado con el fin de lograr la eliminación parcial o total de este sin emplear agentes químicos que causen efectos adversos.

Sistemas biológicos reportados

Tabla 1.
Organismos usados para el control biológico

ORGANISMOS USADOS EN EL CONTROL BIOLÓGICO		
Tipo de agente biológico	Algunos ejemplos	Plagas que controlan
Depredadores	<i>Coleomegilla maculata</i> (Coleoptera: Coccinellidae)	Áfidos, ácaros
	<i>Coccinella septempunctata</i> (Coleoptera: Coccinellidae)	Áfidos
	<i>Chilocorus kuwanae</i> (Coleoptera: Coccinellidae)	Escama bonetera
	<i>Cryptolaemus montrouzieri</i> (Coleoptera: Coccinellidae)	Cochinilla, áfidos, escamas suaves
	<i>Hippodamia convergens</i> (Coleoptera: Coccinellidae)	Áfidos
	<i>Rodolia cardinalis</i> (Coleoptera: Coccinellidae)	Escama algodonosa
	<i>Lebia grandis</i> (Coleoptera: Carabidae)	Escarabajo de la papa
	<i>Chrysoperla carnea</i> (Neuroptera: Chrysopidae)	Áfidos, mosca blanca
	<i>Podisus maculiventris</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Larvas de lepidópteros y coleópteros
	<i>Phytoseiulus persimilis</i> (Acarina: Phytoseiidae)	Ácaros
Parasitoides	<i>Pseudacteon</i> spp. (Diptera: Phoridae)	Hormigas
	<i>Trichopoda pennipes</i> (Diptera: Tachinidae)	Chinches
	<i>Catolaccus grandis</i> (Hymenoptera: Pteromalidae)	Gorgojo
	<i>Muscidifurax raptor</i> (Hymenoptera: Pteromalidae)	Mosca domestica
	<i>Metaphycus Alberti</i> (Hymenoptera: Encyrtidae)	Escama algodonosa
	<i>Encarsia formosa</i> (Hymenoptera: Aphelinidae)	Mosca blanca
	<i>Trichogramma ostrinae</i> (Hymenoptera: Trichogrammatidae)	Taladrador del maíz
	<i>Bathyplectes</i> spp. (Hymenoptera: Ichneumonidae)	Gorgojo de alfalfa
Bacterias	<i>Peristenus digoneutis</i> (Hymenoptera: Braconidae)	Chinches
	<i>Bacillus popilliae</i>	Larvas de Scarabaeidae
	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>	Larvas de lepidópteros
	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	Larvas de mosquitos y otros dípteros
	<i>Bacillus sphaericus</i>	Larva de coleópteros Larva de mosquitos
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Botrytis cinérea</i> , <i>Fusarium</i>

	<i>Bacillus cereus</i>	<i>oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>
	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Phytophthora megasperma</i>
		<i>Alternaria sp.</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Pyricularia oryzae</i>
	Mastigomycotina <i>Coelomomyces spp.</i>	Larvas de mosquitos
	<i>Lagenidium giganteum</i>	Larvas de mosquitos
	Entomophthoraceous	Áfidos, larvas de lepidópteros, coleópteros, Orthoptera
Hongos	Deuteromycotina <i>Beauveria bassiana</i>	Larvas de coleópteros, lepidópteros, Orthoptera
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Larvas de coleópteros, cicadélidos, cercopidos, cucarachas
	<i>Verticillium lecanii</i> <i>Microsporidia</i>	Áfidos, moscas blancas
	<i>Trichoderma</i>	<i>Botrytis cinérea</i>
	Mermithidae	Larvas de mosquitos
Nematodos	Steinernematidae, Heterorhabditidae	Larvas de lepidópteros, larvas de coleópteros, y Gryllotalpidae
	Baculovirus: Virus de la poliedrosis nuclear	Larvas de lepidópteros, larvas de Hymenoptera
	Virus de la granulosis	Larvas de lepidópteros
Virus	Virus no-ocluido (<i>Oryctes</i>)	Larvas de Scarabaeidae
	Virus de la poliedrosis citoplasmática	Larvas de lepidópteros
	Entomopoxviruses	Orthoptera, larvas de Scarabaeidae
	Iridoviruses	Mosquitos

Nota: Algunos de los agentes usados en el control biológico de plagas. (Nicholls Estrada, 2008) y (Tejera Hernández, Rojas Badía, & Heydrich Pérez, 2011)

De acuerdo a la *Tabla 1* existen diferentes organismos que se pueden utilizar en el control biológico de plagas, tanto depredadores, como virus, parasitoides, hongos o bacterias, éstos últimos dos siendo microorganismos antagonistas de patógenos y dentro de los cuales las bacterias son las de mayor importancia para el desarrollo de este proyecto, en el cual se pretendió encontrar bacterias halófilas con la capacidad antagonista para *Botrytis sp.* Estas bacterias son microorganismos que se pueden encontrar en ambientes extremos y dependen de la sal para su

supervivencia. Estos microorganismos se pueden dividir en halófilos débiles, extremos o moderados, estos últimos tienen diferentes usos en la biotecnología y en el laboratorio son fáciles de cultivar, son de requerimientos nutricionales bajos y pueden usar diferentes compuestos como única fuente de carbono y energía. (Ramírez, Sandoval, & Serrano, 2004)

Plaguicidas y su impacto

Los plaguicidas

Los plaguicidas ocupan un importante lugar dentro de las sustancias a las que el hombre está expuesto por su uso extensivo en agricultura para el control de plagas y de vectores transmisores de enfermedades. Existen más de 1500 principios activos que, en distintas mezclas y concentraciones, generan más de 50000 productos registrados como plaguicidas. (Villaamil Lepori, Bovi Mitre, & Nassetta, 2013). Según (López-Geta *et al.*, 1992), citado por (García Gutiérrez & Rodríguez Meza, 2012) en 1992 la producción mundial de plaguicidas se estimó en 10 millones de toneladas de las cuales más del 80% se emplearon en Europa y Estados Unidos, sin embargo en el 2005 el volumen mundial de plaguicidas fue de 6 millones de toneladas y con tendencia al aumento, se estima que para el 2020 llegue a unos 6,5 millones de toneladas de ingrediente activo. El país que mayor demanda de plaguicidas presentó en el año 2012, fue Brasil con 823.000 toneladas por un valor de 9.700 millones de dólares, llegando a ocupar el segundo lugar en el uso de plaguicidas a nivel mundial, después de Estados Unidos (March, 2014).

Hasta mediados del siglo pasado se utilizaron cerca de 40 compuestos de tipo botánico o inorgánico, pero en la actualidad se desconoce de la cantidad y tipos de plaguicidas que se aplican en los campos. Por otra parte y según lo expone (Riccioppo, 2011) se estima que hay

unos 6 millones de productos altamente tóxicos, creados en el siglo XX, de los cuales unas 100.000 sustancias aún se usan y tienen efectos cancerígenos.

De acuerdo a (AgroNews, 2013) citado por (March, 2014) en el año 2012 cerca del 90 % del mercado mundial de plaguicidas estaba repartido tan solo en 10 empresas (Syngenta – Suiza, Bayer – Alemania, Basf – Alemania, Dow – USA, Monsanto – USA, DuPont – USA, Makhteshim Agan – Israel, Nufarm – Australia, Sumitomo Chemical – Japón y Arysta Lifescience – Japón), las cuales en este mismo año registraron ventas de plaguicidas por valor de 46.425 millones de dólares.

Los plaguicidas se pueden clasificar de acuerdo a la toxicidad (DL_{50}) en Clase IA: Extremadamente peligrosos (paratión, dieldrín), Clase IB: Altamente peligrosos (eldrín, diclorvos), Clase II: Moderadamente peligrosos (DDT, clordano) y Clase III: Ligeramente peligrosos (Malatión); según la vida media de efectividad en No persistente: De días hasta 12 semanas (malatión, diazinón, carbarilo, diametrín), Moderadamente persistente: De 1 a 18 meses (paratión, lannate), Persistente: De varios meses a 20 años (DDT, aldrín, dieldrín) y Permanentes: Indefinidamente (productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico); y de acuerdo a la familia química en Organoclorados (DDT, aldrín, endosulfán, endrín), Organofosforados (Bromophos, diclorvos, malatión), Carbamatos (Carbaryl, methomyl, propoxur), Tiocarbamatos (Ditiocarbamato, mancozeb, maneb), Piretroides (Cypermethrin, fenvalerato, permethrin), Derivados bupiridilos (Clorfenatol, diquat, paraquat), Derivados del ácido fenoxiacético (Dicloroprop, picram, silvex), Derivados cloronitrofenólicos (DNOC, dinoterb, dinocap), Derivados de triazinas (Atrazine, ametryn, desmetryn, simazine), Compuestos orgánicos del estaño (Cyhexatin, dowco, plictrán), Compuestos inorgánicos

(Arsénico pentóxido, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio y fósforo blanco) y Compuestos de origen botánico (Rotenona, nicotina, aceite de canola) (Ramírez & Lacasaña, 2001).

Marco legal

En el *Anexo 1*. Marco legal sobre plaguicidas, *Tabla 11* de acuerdo al (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2010) y al (Instituto Colombiano Agropecuario - ICA), se pueden observar diferentes normas que regulan la producción, distribución y aplicación de los plaguicidas e incluso en una gran mayoría de resoluciones expedidas por el ICA se puede apreciar que desde mediados de los años 70's el país ya empezaba a restringir el uso de ciertos plaguicidas de alta toxicidad, pero que incluso años después se siguieron aplicando para el control de plagas, generando considerables efectos negativos en el medio ambiente y la salud humana.

Impactos generados por el uso de plaguicidas

Los plaguicidas son productos muy usados actualmente en la agricultura para el control de diferentes plagas, pero estos a la vez generan efectos nocivos en suelos, cuerpos de agua, plantas, animales, seres humanos y el deterioro del medio ambiente en general. La utilización de los plaguicidas creció con el aumento de la demanda alimentaria y las grandes extensiones agrícolas de monocultivos, donde se generaban plagas al disminuir la biodiversidad, la cual según la (FAO - Organización las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2004), está compuesta por innumerables plantas cultivadas, variedades agrícolas y especies acuáticas con características nutricionales específicas, especies pecuarias adaptadas a ecosistemas difíciles,

insectos que polinizan el campo y microorganismos que regeneran los suelos agrícolas. Dicha biodiversidad se ha visto afectada por el uso indiscriminado de plaguicidas de origen químico para el control de insectos (insecticidas), malas hierbas (herbicidas) u hongos fitopatógenos (fungicidas), los cuales al ser utilizados para el control de una plaga, traen consigo la destrucción del hábitat o eliminación de alimento de organismos benéficos para el equilibrio del ecosistema, ocasionando así la generación de una nueva plaga al no tener competencia, lo que llevaría a la aplicación de más plaguicidas y con esto la resistencia de las plagas a dichos productos. De ahí la importancia de avanzar en el control biológico de plagas, para mantener un equilibrio y control natural de éstas.

Dentro de los impactos causados por los plaguicidas se podrían mencionar algunos de los más importantes como los efectos negativos en medio ambiente, enfermedades en humanos y la resistencia de las plagas a estos productos, lo cual en la mayoría de casos lleva a la aplicación de dosis más elevadas y consigo aumentando sus efectos negativos. En el caso de los efectos causados en los humanos y que están asociados con abortos, malformaciones, esterilización sexual o derivan en enfermedades, pueden ser causados por la exposición aguda o crónica a determinada cantidad y tipo de una sustancia tóxica, a través de las vías respiratoria, digestiva o cutánea, causando efectos locales o generales en el organismo (Riccioppo, 2011).

En la actualidad en muchos países que dependían en gran medida de los plaguicidas, los agricultores y gobernantes han ido tomando conciencia sobre la aplicación de estos, debido a los enormes daños causados al medio ambiente en general y las posibles enfermedades en el hombre a causa del uso excesivo e inadecuado de los plaguicidas; tal motivo ha contribuido a la prohibición de muchos de estos plaguicidas por su alta toxicidad descubierta en diferentes

estudios realizados, además de favorecer el desarrollo de productos alimentarios orgánicos y la implementación de una agricultura más amigable con el entorno.

Patógeno a controlar

Hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos son los causantes de pérdidas de millones de dólares en el sector agrícola debido a la alteración de las funciones fisiológicas de las plantas. Estos microorganismos se pueden encontrar agrupados en varias clases como **Ascomycetes**: pudrición del tallo o cáncer (*Ceratocystis sp.*), mildiu polvoso o blanco (*Erysiphe sp.*), sigatoka o mancha foliar del plátano (*Mycosphaerella sp.*); **Basidiomycetes**: roya del maíz (*Puccinia sp.*), mustia hilachosa del frijol (*Thanatephorus cucumeris*); **Oomycetes**: tizón tardío (*Phytophthora infestans*), mildiu velloso (*Peronospora sp.*), mal del talluelo (*Phytium sp.*); **Deuteromycetes**: Tizón temprano (*Alternaria solani*), moho gris (*Botrytis sp.*); y **Antracnosis**: (*Colletotrichum sp.*), Fusarium (*Fusarium sp.*) (Biblioteca Wilson Popenoe de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano).



Imagen 1. Fusarium wilt en tomate

Estos patógenos pueden llegar a infectar las plantas huéspedes penetrando por diferentes partes de la misma, como por ejemplo la raíz, los tallos, las hojas o las heridas. Tal es el caso del *Fusarium* (Imagen 1) que entra por la raíz de la planta llegando hasta el tallo y produciendo marchitamiento y necrosis de la planta (Villa Martínez, *et al.*, 2015). Otro ejemplo es el *Rhizopus stolonifer*, el cual puede sobrevivir en el suelo por periodos prolongados, sus esporas se esparcen por el aire y al encontrar un huésped y con las condiciones adecuadas se desarrolla atacando principalmente al fruto (Velázquez del Valle, Bautista Baños, Hernández Lauzardo, Gerra Sánchez, & Amora Lazcano, 2008). Referenciando un fitopatógeno más, se tiene el *Macrophomina phaseolina*, un hongo que produce marchitamiento, agotamiento y pudrición del tallo y raíz de su huésped, en esta parte de la planta se producen los microesclerocios que pueden permanecer en el suelo hasta por 15 años, tiempo en el cual con las condiciones adecuadas penetra en los tubos germinativos a través de la epidermis del huésped o también puede penetrar indirectamente por aberturas naturales, en el caso de la primera, mediante enzimas el hongo

degrada la pared celular de la planta y la ramificación del micelio coloniza el tejido vascular propagándose hasta la raíz y causando el marchitamiento (Martínez Villareal, Garza Romero, Moreno Medina, Hernández Delgado, & Mayek Pérez, 2016).

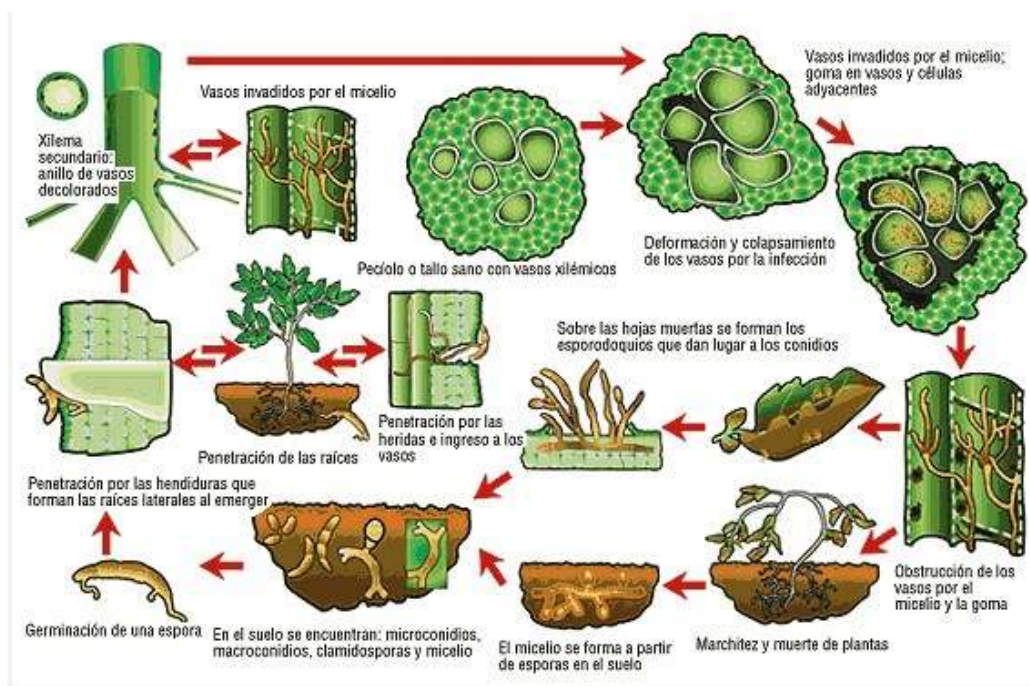


Imagen 2. Ciclo de vida del Fusarium solani

Por lo general el ciclo de vida de la mayoría de los hongos fitopatógenos es similar, infectan la planta entrando por las raíces, hojas, fruto o heridas en el tallo o cualquier otra parte de la planta; tal como se puede apreciar en la *Imagen 2*, donde se tiene como ejemplo el ciclo de vida del *Fusarium solani* o podredumbre seca. Éste hongo saprofita, al igual que *Botrytis cinérea* (*Imagen 3*) penetra en la planta, invadiendo y obstruyendo los vasos y células, hasta causar el marchitamiento de la misma, permaneciendo en ella o en el suelo, incluso por largos periodos de tiempo, donde germina bajo unas condiciones de temperatura y humedad adecuadas, hasta encontrar un nuevo huésped para continuar su ciclo de vida (CANNA) y (Araujo Salvatierra, 2014).

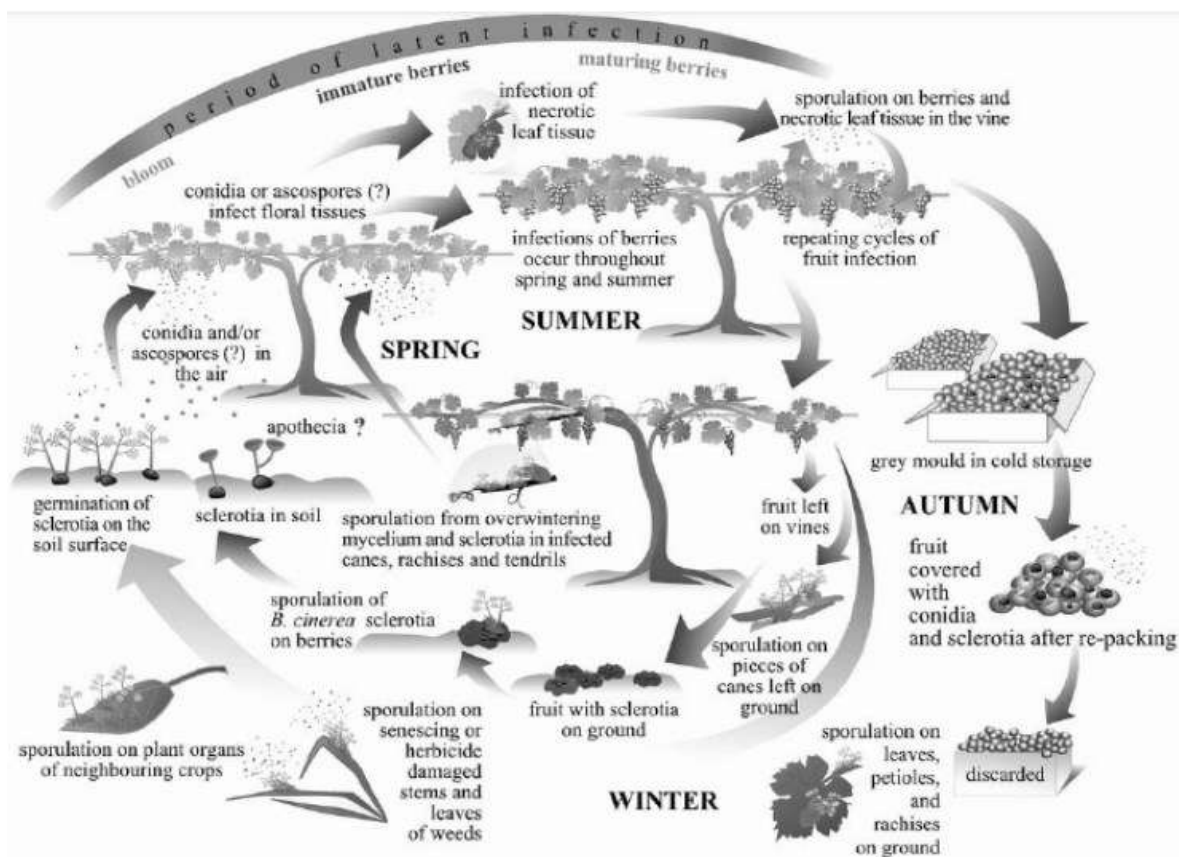


Imagen 3. Ciclo de vida del *Botrytis cinerea* en viñedos (Fuente: (Elad, Williamson, Tudzynski, & Delen, 2007))

Botrytis cinerea

Tabla 2

Clasificación taxonómica del hongo *Botrytis cinerea*

Clasificación taxonómica del hongo <i>Botrytis cinerea</i>	
Dominio	Eucariota
Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Deuteromycete
Familia	Moniliaceae
Genero	<i>Botrytis</i>
Especie	<i>Botrytis cinerea</i>

Nota: Clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea*, según Williamson *et al.*, (2007) citado por (Sanhueza Del Valle, 2012)

Williamson *et al.*, (2007) citado por (Sanhueza Del Valle, 2012), realizaron una identificación taxonómica de este fitopatógeno que hoy en día continua vigente, esta clasificación se presenta en la *Tabla 2*.



Imagen 4. Botrytis cinérea en uva (Fuente: (UdeSantiago al día - Universidad de Santiago de Chile, 2015))

El hongo *Botrytis cinérea* (*Imagen 4*), también conocida como mohogris o podredumbre gris es un patógeno que puede atacar a las plantas más débiles o con deficiencias de nutrientes, causando grandes pérdidas económicas al infectar partes de la planta como las flores y los frutos. Este hongo tiene la capacidad de desarrollarse en muchas plantas en casi todos los climas del mundo y puede afectar casi por completo a la planta huésped, tanto en cultivo como en postcosecha (Marques Costa, 2013). Éste hongo fitopatógeno tiene una fase asexual y una fase sexual durante su ciclo de vida e inicia con la infección de la planta huésped por conidios que son transportados por diferentes factores como el viento o la acción de insectos. Una vez en la planta, si las condiciones ambientales son las adecuadas, el conidio germina y se adhiere a la superficie de las células vegetales, donde una vez infectado, se inicia la fase de latencia en la

cual se presenta necrosis en la planta y el hongo puede llegar a invadirla por completo, dando inicio a un nuevo ciclo con la generación de esporas. (Marques Costa, 2013)

Las condiciones óptimas para el desarrollo del hongo *Botrytis cinérea* oscilan entre los 15 y 25 grados de temperatura y una humedad relativa superior al 80%. Este hongo ante unos tratamientos adecuados y unas condiciones de baja humedad y temperaturas cercanas a 0° C o superiores a 30° C puede permanecer sin manifestarse por varios años, hasta que las condiciones son adecuadas para su aparición e infección de la planta.

Impactos en la agricultura, causados por el hongo Botrytis cinérea

Se ha evidenciado que el control de esta enfermedad, representa unos gastos económicos alrededor de US\$ 71.04 por hectárea, solamente en productos químicos, durante 13 meses de tratamiento, además de otros gastos que sumados pueden llegar a un total de US\$ 85,5 por hectárea (Rubio, Alfonso , Grijalba, & Pérez, 2014). El manejo químico es la base principal del manejo actual, pero con el tiempo se genera una resistencia, esto influye en el siguiente año de cultivo porque obliga a realizar mayores aspersiones de agroquímicos, lo que ha originado contaminación ambiental en suelos, fuentes hídricas cercanas y daño perjudicial en la salud pública. (Reinoso Pozo, Vaillant Flores, Casadesús Romero, García Pérez, & Pazos Álvarez-Rivera, 2007)

Colombia se caracteriza por ser un país agricultor y ganadero, sin embargo, para el proyecto se examinará más el área agrícola, específicamente en cultivos de fresa, siendo la fresa un cultivo de importancia económica (Hernández Rodríguez, Heydrich, Velázquez del Valle, & Hernández Lauzardo, 2006). Este cultivo durante su producción es afectado por numerosas enfermedades,

entre las más comunes se encuentra la causada por hongos patógenos como la podredumbre gris (*Botrytis cinérea/Sclerotinia fuckeliana*) que atacan los cultivos de frutas, hortalizas y plantas de ornamentación, ocasionando grandes pérdidas al mercado agricultor (Álvarez Barragán, 2012). Este suceso no solo acontece en Colombia, el hongo tiene la capacidad de establecerse a diferentes latitudes y adaptarse a condiciones climatológicas poco favorables, buscando un huésped que permiten su desarrollo en sus más óptimas condiciones, detectándose por tal razón en otros países y continentes.

La fresa se cultiva en diferentes zonas y climas del mundo, es un cultivo de gran importancia social y comercial y según datos de la FAO, la fresa supera el 62% de la producción mundial de frutas finas con un área cultivada de 254.027 hectáreas que representan una producción aproximada de 5 millones de toneladas por año, donde Estados Unidos se encuentra como principal productor con 1'312.960 toneladas/año, seguido por Turquía con 302.416 toneladas/año y España con 262.730 toneladas/año. Mientras que en Colombia en el año 2011 su área de cultivo era de 1.130 hectáreas, con una producción de 45.000 toneladas/año y un rendimiento aproximado de 39.718 kg/ha, con una distribución de cultivos principalmente en los departamentos de Cundinamarca con un 63,4%, Antioquia con 23,8%, Norte de Santander con 7%, Cauca con 3,6%, Boyacá con 1,6% y otros con 0,6% (Cano T, 2013)

Bacterias halófilas

Tabla 3

Clasificación de los microorganismos halófilos de acuerdo a sus requerimientos de NaCl

Clasificación	Concentraciones de NaCl % (p/v)
Halotolerantes	0 – 5
Halófilos débiles	1 – 5
Halófilos moderados	5 – 15
Halófilos extremos	15 – 30

Nota: Clasificación de los microorganismos halófilos tomado de (Garzón Rubiano, 2016)

Las bacterias halófilas son microorganismos que se pueden encontrar en ambientes extremos y pueden ser tolerantes a diferentes concentraciones de sal o incluso pueden necesitarla para su supervivencia. Estos microorganismos tal como se aprecia en la *Tabla 3*, se pueden dividir de acuerdo al requerimiento de concentración de sal en halotolerantes, halófilos débiles, extremos o moderados. Estos últimos tienen diferentes usos en la biotecnología y en el laboratorio son fáciles de cultivar, son de requerimientos nutricionales bajos y pueden usar diferentes compuestos como única fuente de carbono y energía (Ramírez, Sandoval, & Serrano, 2004).

Las bacterias halófilas son la productoras de enzimas hidrolíticas extracelulares tales como amilasas, proteasas, lipasas, ADNasas, pululanases, fosfatasas, xilanasas y nucleasas que tienen diferentes usos, como su gran poder antagonista contra diferentes hongos fitopatógenos debido a la producción de antibióticos y metabolitos antifúngicos, que son capaces de controlar a estos, mediante la producción de enzimas hidrolíticas que degradan las paredes de las células fúngicas, especialmente las quitinasas y las β -1,3-glucanasas, siendo agentes con gran poder de control biológico (Essghaier, *et al.*, 2009).

Los microorganismos halófilos para su adecuado desarrollo requieren de una temperatura promedio de 30° C con una variación de 27° – 40° C; son por lo general neutrófilas y crecen en ambientes con pH de 6,8 – 7, aunque algunas bacterias anaerobias pueden tener pH de 8 – 10, pero la mayoría de bacterias halófilas son aerobias (Garzón Rubiano, 2016)

Área de estudio y toma de muestras

Área de estudio

Para la realización del muestreo se seleccionaron los municipios de Guasca (Latitud: 4° 52' 34.38" N, Longitud: 73° 51' 28.16" O), Choachí (Latitud: 4° 33' 2.27" N, Longitud: 73° 55' 0.57" O) y Tabio (Latitud: 4° 55' 24.94" N, Longitud: 74° 6' 19.81" O) en el departamento de Cundinamarca (*Imagen 5*), lugares donde estaban ubicados los yacimientos de acuíferos termales, a partir de los cuales fueron tomadas las muestras en la zona más próxima al manantial, con la menor presencia de agentes externos que alteraran las propiedades del agua y realizando la medición de temperatura y pH de cada muestra (*Imagen 6*).

Para la realización del muestreo se seleccionaron los municipios de Guasca (Latitud: 4° 52' 34.38" N, Longitud: 73° 51' 28.16" O), Choachí (Latitud: 4° 33' 2.27" N, Longitud: 73° 55' 0.57" O) y Tabio (Latitud: 4° 55' 24.94" N, Longitud: 74° 6' 19.81" O) en el departamento de Cundinamarca (*Imagen 5*), lugares donde estaban ubicados los yacimientos de acuíferos termales, a partir de los cuales fueron tomadas las muestras en la zona más próxima al manantial, con la menor presencia de agentes externos que alteraran las propiedades del agua y realizando la medición de temperatura y pH de cada muestra (*Imagen 6*).

Toma de muestras

Se tomaron muestras de agua a partir de manantiales termales y salinos ubicados en los municipios de Guasca, Choachí y Tabio en el Departamento de Cundinamarca. Una vez en el sitio del muestreo se cuantificaron los parámetros de temperatura y pH del agua (*Imagen 6*), posteriormente se llevó a cabo la recolección de las muestras en tubos tipo Falcon estériles de 50 ml y frascos debidamente esterilizados que se rotularon, almacenaron y preservaron según metodología (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales - IDEAM). Una parte de la muestra tomada fue transportada a un laboratorio especializado para los análisis fisicoquímicos y la otra parte al laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD) para ser usada como medio de cultivo e inóculo en el aislamiento de los microorganismos.



Imagen 6. Izquierda: termómetro de punzón TECNIK. Derecha: Equipo de medición multiparámetro Cobra 4 Mobile – Link (pH)

Caracterización Físicoquímica de las Muestras

La temperatura y pH de cada manantial se registraron in-situ. Los análisis de agua y lodos que determinaron la cantidad de los parámetros físicoquímicos de conductividad, bicarbonato, hierro total, sulfato, calcio, sodio, magnesio, manganeso, potasio y sólidos disueltos totales se realizaron en un laboratorio de referencia de acuerdo al standard methods (Eaton *et al.*, 2005) y con registro acreditado.

Enriquecimiento, Aislamiento y Caracterización de Microorganismos Halófilos y

Halotolerantes con Potencial Actividad Antagónica.

Medios de cultivo utilizados

Tabla 4

Medio de cultivo LB (Caldo de Luria Bertani)

Medio de cultivo LB	
NaCl	23 g/l
YE (Extracto de levadura)	5 g/l
Peptona	10 g/l
Agar	15 g/l

Nota: Adaptado de la literatura consultada y los conocimientos del director del proyecto.

Tabla 5

Medio de cultivo Básico

Medio básico	
NH₄Cl	1 g/l
K₂HPO₄	0,3 g/l
KH₂PO₄	0,3 g/l
MgCl₂ 6H₂O	3 g/l
CaCl₂ 7H₂O	0,1 g/l
KCl	0,1 g/l
NaCl	23 g/l
MgSO₄ 7H₂O	01 g/l
FeSO₄	0,02 g/l
YE (extracto de levadura)	5 g/l

Nota: Adaptado de la literatura consultada y los conocimientos del director del proyecto.

Tabla 6*Metodología de medio de cultivo MEA*

Medio de cultivo MEA (Extracto de malta y agar – agar)	
Extracto de malta	10 g/l
Agar – Agar	15 g/l
Glucosa	2 g/l

Nota: Metodología utilizada acuerdo a (Santiago, Huilínir, Cottet, & Castillo, 2016), la cual contiene un medio de cultivo MEA (extracto de malta y agar – agar, por sus siglas en Inglés) y donde parte de la muestra va con glucosa y la otra parte sin ella.

Enriquecimiento

Una vez fueron tomadas las muestras de agua y llevadas al laboratorio para la preservación y ensayos, se tomaron 5 ml de esta y fueron adicionados a tubos tipo Falcon que contenían medio básico de sales, en esta etapa fueron utilizadas diferentes fuentes de carbono, las cuales eran suministradas a cada tubo, con el fin de abarcar variedad metabólica y por ende lograr aislamiento de diferentes morfotipos. Seguidamente los tubos se rotularon y llevaron a incubación a una temperatura aproximada de 37° C durante 48 horas.

Aislamiento

Para el diseño de estos medios de cultivo se tuvo en cuenta el uso de diferentes aceptores de electrones (O_2 , NO_3 , SO_4 , Mg^{+4} , Fe^{+3} entre otros), diferentes concentraciones de fuentes de carbono y diferentes relaciones en el contenido carbono: nitrógeno, pH, salinidad y temperatura, entre otros, buscando al máximo mimetizar en estos medios las condiciones de los hábitats.

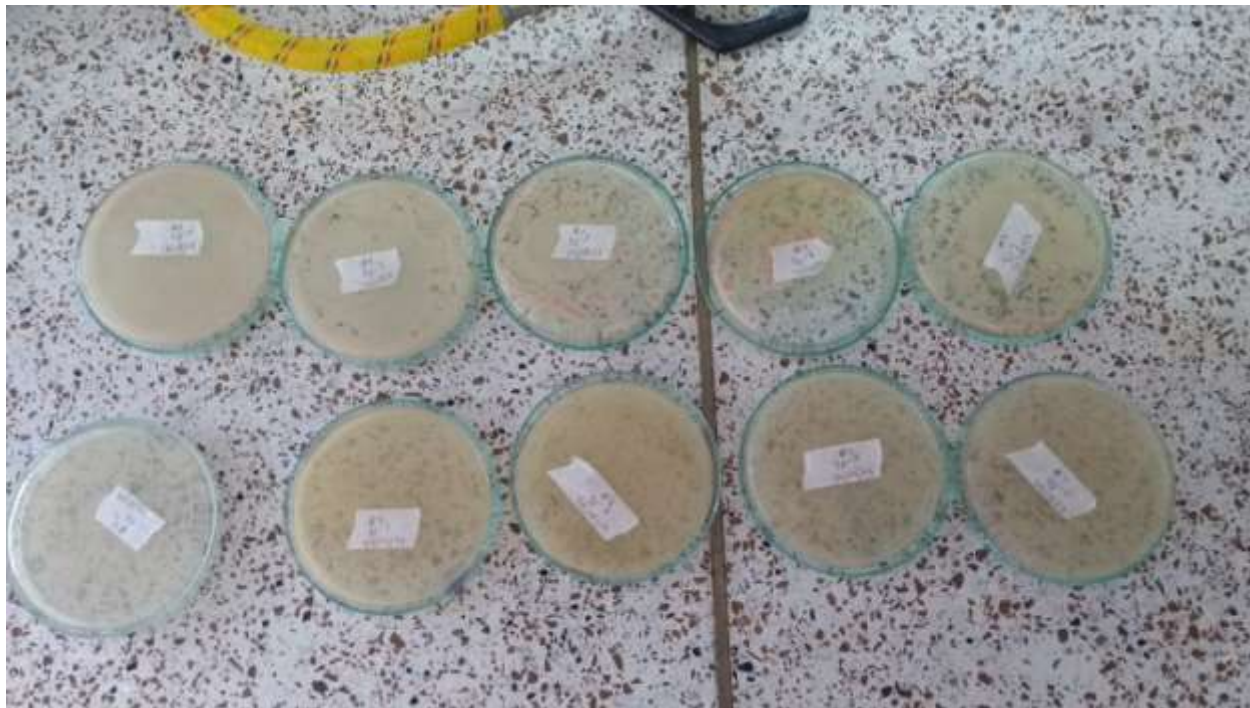


Imagen 7. Aislamiento y siembra de microorganismos con posible capacidad antagónica de Botrytis sp.

Una vez transcurrido el periodo de incubación, se realizaron diluciones usando un factor de dilución de 1/10 para facilitar el aislamiento de diferentes fenotipos. Esto se llevó a cabo añadiendo 1 ml de la muestra en 9 ml de una solución salina y agitando ligeramente; luego se repite el proceso a partir del tubo diluido para así obtener diluciones seriadas en base 10. Posteriormente cada dilución se sembró en una caja de Petri con medio de cultivo básico de sales, añadiendo agar bacteriológico para su solidificación (*Tabla 4* y *Tabla 5*), dicha siembra fue realizada por duplicado, con el objetivo de obtener colonias aisladas para realizar su caracterización y purificación como se muestra en la *Imagen 7*.

Transcurrido dicho periodo de tiempo de 48 horas se obtuvieron cajas con crecimiento de colonias de diferentes morfologías macroscópicas como se observa en la *Imagen 8*. Con la ayuda de un asa metálica, se fueron aislando una y otra vez las colonias representativas de cada morfología para obtener cultivos puros como se puede observar en la *Imagen 9*.

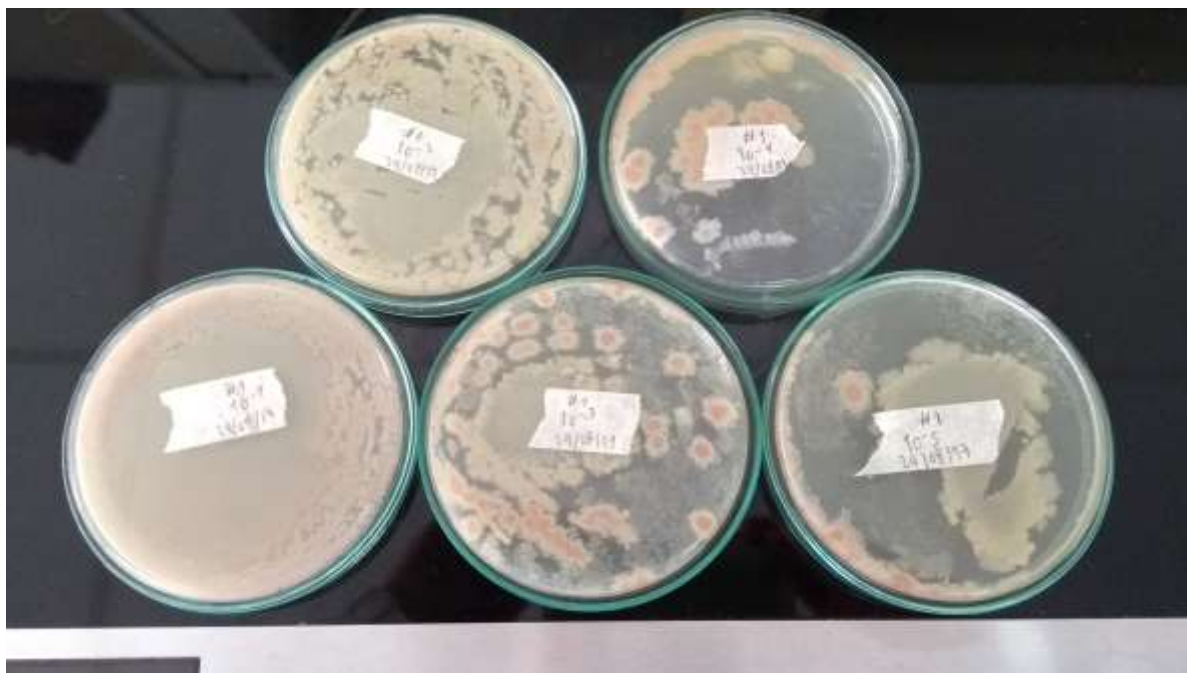


Imagen 8. Crecimiento de colonias

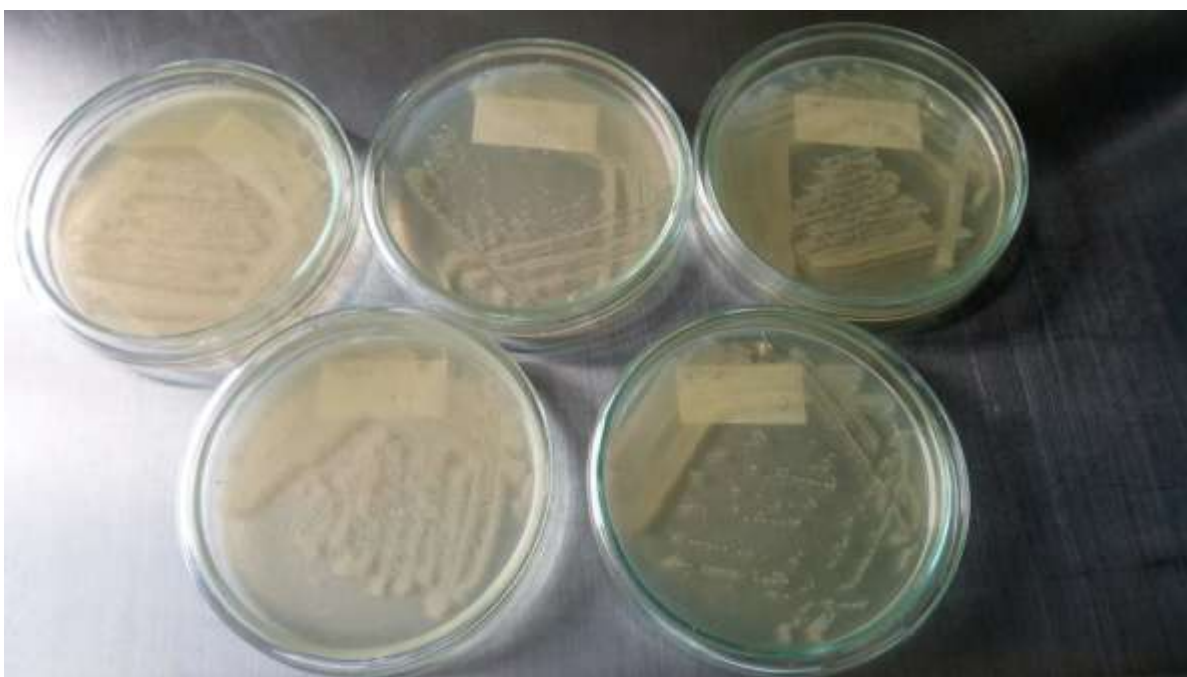


Imagen 9. Colonias aisladas

Caracterización



Imagen 10. Caracterización morfológica de bacterias (Fuente: (Villarreal Sánchez, 2013))

Una vez aisladas las cepas bacterianas características de cada morfología obtenida, se procedió a la caracterización macroscópica y microscópica; la primera con base a la *Imagen 10*, donde se determinó forma, elevación, margen y color de cada colonia; y la segunda de acuerdo a la tinción Gram.

Análisis del grado de halofilia

Para comprobar que las bacterias aisladas en el laboratorio se trataban de bacterias halófilas, se cultivaron en tubos con medios líquidos bajo tres concentraciones de NaCl (5%, 10% y 20%) usando como base el medio de cultivo LB. Cada cepa fue cultivada por triplicado y su crecimiento celular fue cuantificado mediante la medición de su absorbancia. Se implementó para cada unidad experimental un control sin concentración de sal.

Ensayos de evaluación antagonica de los microorganismos

Ensayo in vitro

Con el fin de escoger bacterias con potencial para el control biológico de *Botrytis cinérea*, fue aplicada una metodología cualitativa que permitió la observación del comportamiento antagonista en cajas de Petri con medio solido. Con base en la investigación de Santiago, Huiliñir, Cottet, & Castillo, en 2016, fue usado el medio de cultivo MEA (extracto de malta y agar – agar, por sus siglas en Inglés) en proporciones de 10 g/l de extracto de malta, 15 g/l de agar – agar y 2 g/l de glucosa. Se colocó un disco de 5 mm de micelio fúngico de *Botrytis cinérea* en el centro de la placa de Petri que contenía el medio de cultivo, y los aislados bacterianos se sembraron en cuatro puntos equidistantes, inoculando cantidades iguales. La actividad antifúngica se controló durante siete días a una temperatura de 20° C. En cada caja se dispuso un espacio para el control, en el cual no se inoculó con ningún tipo de microorganismo. Cada bacteria aislada fue evaluada por triplicado en medio con glucosa y sin glucosa (Santiago, Huiliñir, Cottet, & Castillo, 2016) como se puede observar en la *Imagen 11*.

Una vez identificadas las bacterias cualitativamente, por medio de la observación de la presencia de halos de inhibición, se procedió a la cuantificación de la inhibición del crecimiento del hongo, por medio de la implementación de un ensayo de enfrentamiento dual. En cajas de Petri con medio MEA, se inoculó masivamente un extremo de la caja con la bacteria a evaluar, a una distancia de 15 mm del borde externo; al frente y a una distancia similar del borde, se dispuso un disco del hongo fitopatógeno. Se hizo la medición del diámetro del hongo diariamente durante 12 días. El control se dispuso inoculando el hongo con un disco de la misma manera, pero sin enfrentarlo a un cultivo bacteriano (*Imagen 12*)

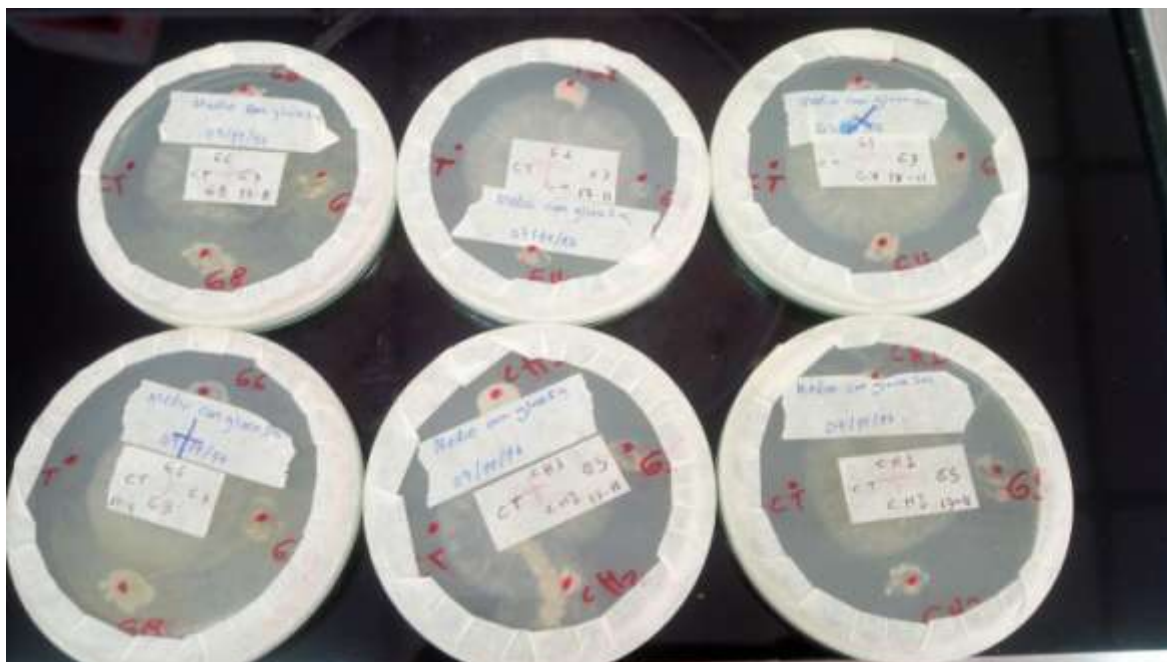


Imagen 11. Ensayo in vitro de la capacidad antagónica de los microorganismos de acuerdo a la metodología de (Santiago, Huiliñir, Cottet, & Castillo, 2016)

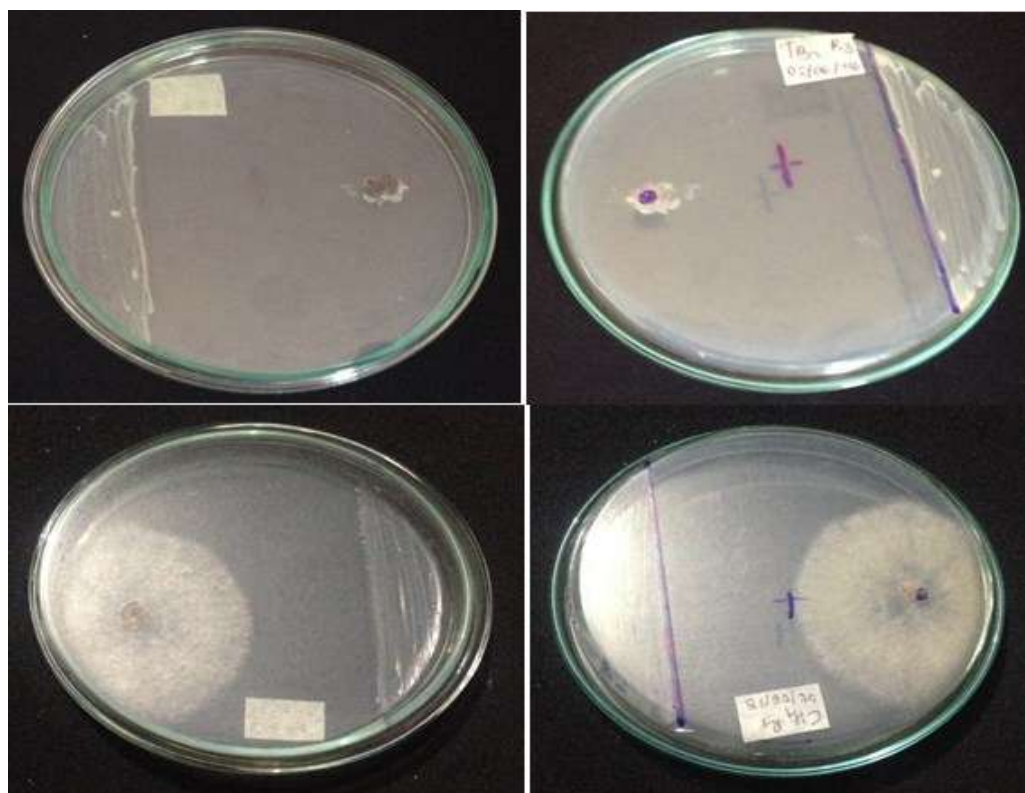


Imagen 12. Ensayo de enfrentamiento dual

Ensayo in planta

Por otra parte se realizaron pruebas *in planta* usando como modelo el cultivo de fresa. Para ello se seleccionaron frutos maduros y se desinfectaron con dos lavados de hipoclorito al 1% y alcohol al 70% para evitar contaminación bacteriana proveniente de la manipulación. Se cortaron pequeñas rodajas de aproximadamente 5 milímetros de espesor que se colocaron dentro de cajas plásticas transparentes y estériles. Una vez estaban las fresas en las cajas se colocó papel absorbente y agua esterilizada para mantener la humedad (*Imagen 13*), posteriormente se aplicaron 200 µl de las muestras de la bacteria con una concentración celular de aproximadamente 4×10^8 UFC, la cual fue ajustada por medio de la absorbancia del medio de cultivo líquido. Las fresas se mantuvieron a temperatura ambiente y de refrigeración durante un día. Pasado el periodo de estabilización, se inoculó el hongo patógeno en el centro de la rodaja de fresa y nuevamente se dejó a temperatura ambiente y refrigeración. Para evaluar la capacidad antifúngica se realizó la medición del diámetro de crecimiento de la infección diariamente.



Imagen 13. Ensayo en fresas

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Toma de muestras

Caracterización fisicoquímica de las muestras



Imagen 14. Toma de muestras

En el lugar de muestreo se realizaron las pruebas físicas de temperatura y pH las cuales presentaban similitudes, ya que la temperatura era cercana a los 50 °C y el pH estaba entre 6,7 y 6,8. Posteriormente se tomaron las muestras en tubos Falcon (*Imagen 14*) y recipientes plásticos debidamente esterilizados, para llevarlos al laboratorio de microbiología de la UNAD. Estas muestras también fueron analizadas por laboratorios de referencia para así determinar todas las propiedades fisicoquímicas del agua, como conductividad, turbidez, dureza, alcalinidad, sólidos suspendidos, DBO, DQO, Oxígeno Disuelto, color, sulfatos, fosfatos y nitratos, entre otros (*Anexo 2. Análisis fisicoquímicos del agua*).

Aislamiento de bacterias

La estrategia de aislamiento empleada en este estudio se basó en las características fisicoquímicas de los sitios de muestreo. Según los resultados, las aguas termales tienen altos contenidos de cloruros, sulfatos, sodio, calcio y magnesio (*Anexo 2. Análisis fisicoquímicos del agua*). Todos los componentes se tuvieron en cuenta para el diseño del medio de cultivo que se usó en el aislamiento en medio sólido, medio básico de sales (*Tabla 5*). Además, el diseño involucró la consulta de medios de cultivo reportados en la literatura que habían registrado buenos resultados en la recuperación de microorganismos halófilos y halotolerantes. Para garantizar la presencia de elementos traza presentes en las muestras, se usó agua esterilizada proveniente de los acuíferos termales para la preparación de los medios de cultivo. El uso de diferentes fuentes de carbono (*Imagen 15*) tuvo como fin abarcar metabolismos variados y para facilitar el aislamiento de diferentes morfotipos bacterianos.



Imagen 15. Enriquecimiento de las muestras

Así, como se puede observar en la *Imagen 16*, fue posible obtener el crecimiento de diferentes morfologías bacterianas, una vez aplicado el enriquecimiento y posterior siembra por estrías en cajas de Petri. Estas siembras en medio solido se repitieron hasta obtener cepas puras con las cuales proceder en las pruebas de antagonismo.



Imagen 16. Primeros resultados aislamiento de bacterias

Basándonos en la bibliografía que cita diferentes métodos y medios de cultivo para aislar las bacterias halófilas, obtener cepas más puras y posteriormente aplicarlas en diferentes procesos biotecnológicos; el proyecto se encamino hacia los resultados esperados, debido a la comparación con los resultados obtenidos por los diferentes autores. Por enumerar algunos casos, uno de ellos es el trabajo de investigación realizado en las salinas de Zipaquirá por (Garzón Rubiano, 2016), donde una vez realizada la siembra de las muestras recolectadas en un medio de cultivo de agar TSA + NaCl y posteriormente partiendo de la caracterización morfológica de las

colonias halladas, se llevo a cabo el aislamiento por estrías en placas y la respectiva incubación. Repitiendo este proceso unas 5 veces para obtener una mayor pureza de los microorganismos.

Otro caso en el que se puede apreciar el aislamiento de las bacterias halófilas es el trabajo desarrollado por (Villota Meza, 2014), en el cual se aíslan microorganismos provenientes de las aguas marinas de la costa ecuatoriana, para los cuales se utilizaron medios de cultivo de agar nutritivo y medio EC, se les añadieron nutrientes y sales para simular las condiciones naturales del agua salada y se procedió a la siembra directa de la muestra. Una vez obtenido el crecimiento de cepas, se realizó el estriado para obtener cultivos más puros y así poder determinar el medio más apto para el crecimiento de las bacterias halófilas.

Nombrando un ejemplo más, (Flores, Zavaleta, Zambrano, Cervantes, & Izaguirre, 2010) realizó un estudio para caracterizar bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico, en diferentes ambientes salinos de Perú. En este estudio se hallaron 32 aislados bacterianos, los cuales fueron aislados en medio de cultivo agua de sales (SW, Sea Water – por sus siglas en inglés) al 10% junto con extracto de levadura al 0,5%.

Caracterización morfológica de las bacterias aisladas

Tras haber realizado los aislamientos necesarios, se llevó a cabo la caracterización morfológica, tanto macroscópica como microscópicamente. En total fueron aisladas 15 cepas bacterianas, las cuales fueron clasificadas con una G para aquellas aisladas de muestras provenientes del punto de muestreo de Guasca; La sigla CH se otorgó a las cepas provenientes del punto de muestreo en Choachí, y las TB para las provenientes de Tabio.

En la medida que se fueron realizando los ensayos de enfrentamiento al fitopatógeno , se fue reduciendo el número de cepas para su uso potencial en el control biológico de *Botrytis Spp.* en la tabla 7 y 8 se presenta la caracterización macroscópica y microscópica de las cepas que presentaron actividad antagonica.

Tabla 7

Caracterización macroscópica de Bacterias que presentaron antagonismo.

CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA				
COLONIA	FORMA	COLOR	ELEVACIÓN	MARGEN
G1	Irregular	Rosado cremoso	Elevada	Lobulado
CH1	Irregular	Blanco opaco	Elevada	Lobulado
CH2	Puntiforme	Blanco	Convexa	Entero
TB1	Irregular	Transparentoso	Elevada	Ondulado
TB3	Circular	Blanco opaco	Umbonada	Entero

Nota: Caracterización morfológica de las colonias halladas, realizada en el laboratorio (Fuente: Los autores)

Tabla 8

Caracterización microscópica de bacterias que presentaron antagonismo.

CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA			
COLONIA	P. CATALASA	P. OXIDASA	P. GRAM
G1	Positivo	Positivo	Bacilos alargados gram positivos esporulados
CH1	Positivo	Negativa	Bacilos alargados gram positivos
CH2	Positivo	Negativa	Cocos
TB1	Positivo	Positivo	Bacilo
TB3	Positivo	Negativa	Bacilos alargados gram positivos

Nota: Caracterización microscópica de las bacterias halladas en la fuente termal de Guasca (Fuente: Los autores)

A medida que se iban realizando los muestreos y respectivo proceso de aislamiento de los microorganismos hallados en las aguas de las fuentes termales, se iba realizando la caracterización morfológica de las colonias bacterianas halladas, a las que en la caracterización microscópica se pudo determinar que la mayoría de las bacterias, tenían una morfología bacilar, lo que de acuerdo a la bibliografía consultada, este tipo de microorganismos tenían antecedentes de control biológico. Posteriormente se iniciaron las pruebas de antagonismo para descartar las cepas que no presentaron actividad antagonica frente a *Botrytis cinérea* y las que mejores resultados presentaron se muestran en la (Tabla 8).

Análisis del grado de halofilicidad

Tabla 9

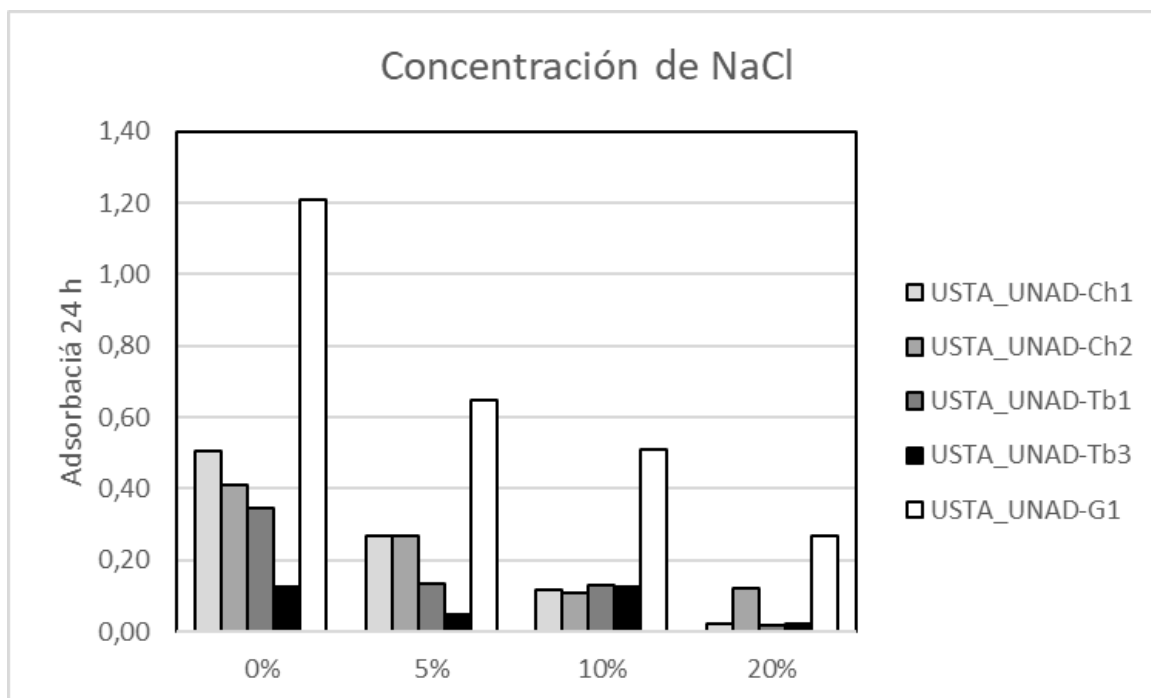
Análisis fotométrico de absorbancia de las bacterias que presentaron mejor actividad antagónica.

Especie	CEPA	Tratamiento % sal	6 horas			24 horas			Análisis			PROM
			R1	R2	R3	R1	R2	R3	ABCPA (R1)	ABCPA (R2)	ABCPA (R3)	
<i>Bacillus cereus</i>	CH1	0	0,220	0,274	0,170	0,520	0,483	0,510	1,03	1,19	0,78	1,00
		5	0,064	0,113	0,072	0,183	0,425	0,199	0,11	0,43	0,13	0,22
		10	0,028	0,035	0,044	0,115	0,101	0,135	0,03	0,03	0,05	0,04
		20	0,018	0,014	0,019	0,021	0,033	0,009	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CH2	0	0,156	0,147	0,164	0,447	0,409	0,376	0,63	0,54	0,55	0,57
		5	0,139	0,137	0,155	0,236	0,234	0,334	0,30	0,29	0,46	0,35
		10	0,112	0,119		0,132	0,190		0,13	0,20	0,00	0,11
		20	0,069	0,056	0,054	0,124	0,120	0,118	0,08	0,06	0,06	0,06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TB1	0	0,257	0,245	0,244	0,415	0,309	0,320	0,96	0,68	0,70	0,78
		5	0,093	0,095		0,130	0,127	0,149	0,11	0,11	0,00	0,07
		10	0,024	0,013	0,071	0,116	0,125	0,143	0,02	0,01	0,09	0,04
		20	0,021	0,034		0,030	0,022	0,007	0,01	0,01	0,00	0,00
<i>Bacillus subtilis</i>	TB3	0	0,122	0,112	0,091	0,105	0,126	0,152	0,11	0,13	0,12	0,12
		5	0,102	0,149	0,146	0,037	0,034	0,079	0,03	0,05	0,10	0,06
		10	0,047	0,048	0,040	0,146	0,146	0,087	0,06	0,06	0,03	0,05
		20	0,032	0,025		0,035	0,031		0,01	0,01	0,00	0,01
<i>Bacillus subtilis</i>	G1	0	1,07	1,01	1,01	1,01	1,05	1,56	2,08	2,05	2,56	2,23
		5	0,31	0,43	0,53	0,53	0,78	0,64	0,83	1,20	1,17	1,07
		10	0,33	0,34	0,53	0,53	0,51	0,49	0,86	0,84	1,02	0,91
		20	0,05	0,03	0,22	0,22	0,27	0,31	0,27	0,34	0,49	0,37

Nota: Análisis fotométrico de absorbancia de las bacterias halladas, con tres diferentes concentraciones de sal (Fuente: Laboratorio)

Gráfico 1

Absorbancia con diferentes concentraciones de NaCl a 24 horas



Fuente de: Los autores, 2018.

Las bacterias halófilas se pueden dividir de acuerdo al requerimiento de concentración de sal en halotolerantes, halófilos débiles, extremos o moderados (Garzón Rubiano, 2016). Bajo esta premisa, fue aplicado un ensayo para determinar si las bacterias aisladas tenían tolerancia a la presencia de sal en concentraciones de 5%, 10% y 20%. Así, se evaluaron todas las cepas aisladas y fue construida la *Tabla 9* que muestra las cepas que presentaron crecimiento a una concentración de 20 % de NaCl, representando el conjunto de las bacterias con mayor afinidad por la misma. Además, se evidencio actividad antagónica frente al hongo *Botrytis cinérea* por parte de dichas bacterias; estos resultados se mostrarán más adelante en el documento.

En el *Gráfico 1* se muestra el análisis del crecimiento bacteriano de 5 de las cepas aisladas. De la gráfica se puede deducir, al observar el comportamiento de la cepa G1, que la presencia de

la sal en el medio de cultivo inhibe significativamente el crecimiento, sin embargo, no impide completamente su desarrollo. Las otras cepas aisladas, también se vieron afectadas por las concentraciones crecientes de sal, también se observa un menor desarrollo celular en todas las concentraciones de sal, comparado con la cepa G1. Esto puede deberse a que esta última tiene una mayor tasa de crecimiento bajo las condiciones evaluadas.

En conclusión, el ensayo permitió determinar que 5 de las bacterias aisladas se pueden clasificar entre halófilas moderadas y halófilas extremas ya que crecieron en presencia de concentraciones de 20 % de sal.

Luego de someter a las cepas aisladas a los cultivos bajo diferentes concentraciones de NaCl, se comparó el área bajo la curva de crecimiento para los dos tiempos en los que se hizo el acompañamiento de la absorbancia como variable dependiente. Los resultados de la cuantificación de la absorbancia para cada cepa se pueden observar en la *Tabla 9*. De los aislamientos obtenidos (*Gráfico 1*), se destacaron las cepas G1, TB3, TB1, CH1 y CH2 por tener mejor desarrollo celular tanto a las 6 horas de cultivo como a las 24 horas en cada una de las concentraciones evaluadas.

Ensayo de la capacidad antagonica de las bacterias halladas

Ensayo in vitro

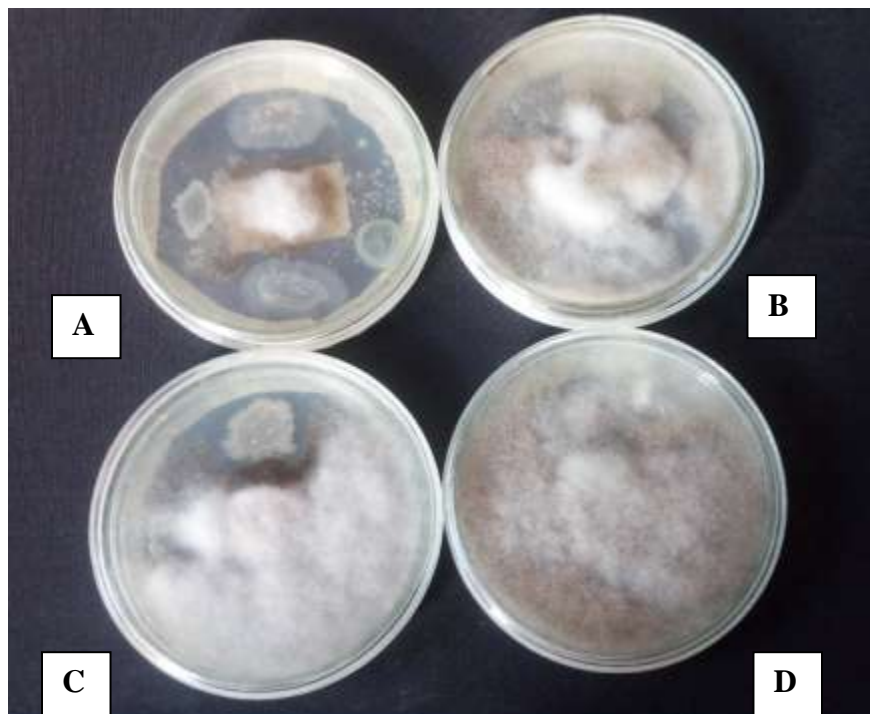


Imagen 17. Resultados parciales antagonismo

Se escogió la metodología de (Santiago, Huiliñir, Cottet, & Castillo, 2016), ya que permite la comparación de varias cepas y su evaluación de la capacidad antagónica simultánea en cajas de Petri utilizando el medio de cultivo MEA (extracto de malta y agar – agar, por sus siglas en Inglés) en proporciones de 10 g/l de extracto de malta, 15 g/l de agar – agar y 2 g/l de glucosa, esta última solo para la mitad del ensayo, debido a que la otra parte no debía llevar glucosa.

Para la realización de este ensayo se dispuso el medio de cultivo MEA en cajas de Petri y se procedió a dividir la caja en 4 partes iguales donde 3 de los 4 puntos equidistantes se inocularon con un tipo de bacteria diferente y el otro punto se dejó de control. A continuación se dejaron las cajas a temperatura ambiente de 20° C aproximadamente por 24 horas, donde posteriormente se

inoculó el hongo *Botrytis cinérea* en el centro de la caja, dejándolas nuevamente en las mismas condiciones ambientales alrededor de 7 días y así comprobar la capacidad antagónica de cada una de las bacterias en medio de cultivo con glucosa y sin glucosa (*Imagen 11*).

Como se puede observar en la *Imagen 17*, en la caja de Petri A y parte superior de la caja C, transcurridos varios días desde el inicio del ensayo de antagonismo, se pudo observar la inhibición del crecimiento o aislamiento del hongo *Botrytis cinérea* por parte de algunas de las bacterias usadas en la prueba, ya que como se observa en las otras cajas, el hongo fitopatógeno invadió completamente el cultivo, incluso cubriendo las bacterias que como se puede observar en la parte derecha de la *Imagen 18*, aún parecen activas, pero no han llegado a frenar o aislar el crecimiento del hongo. De esta manera fue posible determinar cualitativamente cual de las cepas aisladas evidenciaba un comportamiento antagonista frente al crecimiento del hongo. Como se puede observar en la *Imagen 18*, la cepa TB1 impidió la colonización del hongo en la fracción del medio sólido que se encontraba creciendo. Además se observa un halo entre la bacteria y el hongo, probablemente debido a la difusión de moléculas en el medio sólido, producto del metabolismo bacteriano, que impiden el crecimiento normal del hongo fitopatógeno.

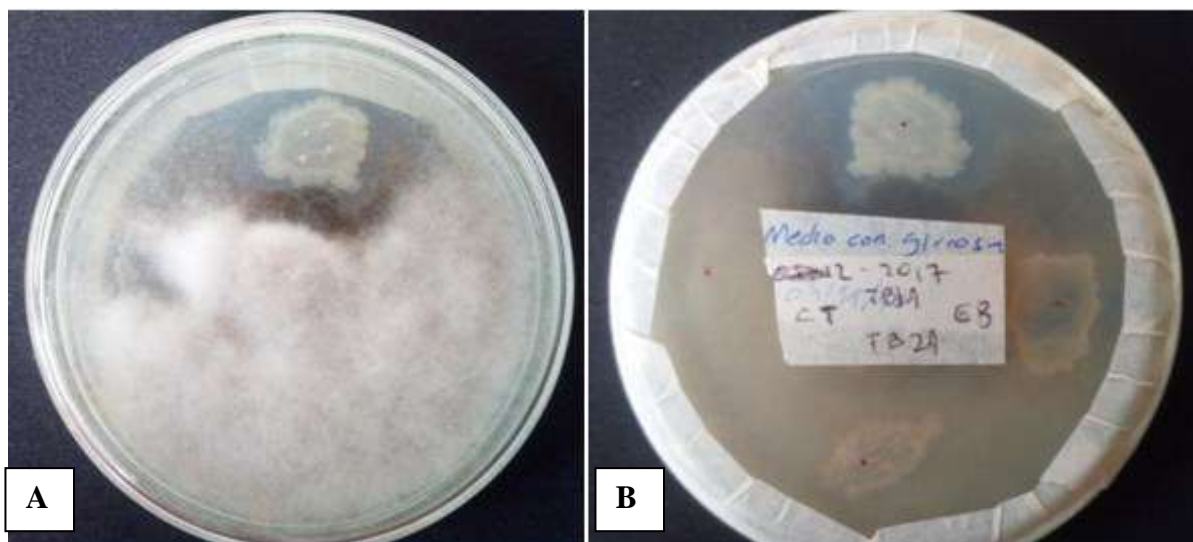


Imagen 18. Cubrimiento del medio de cultivo por el hongo *Botrytis cinerea*

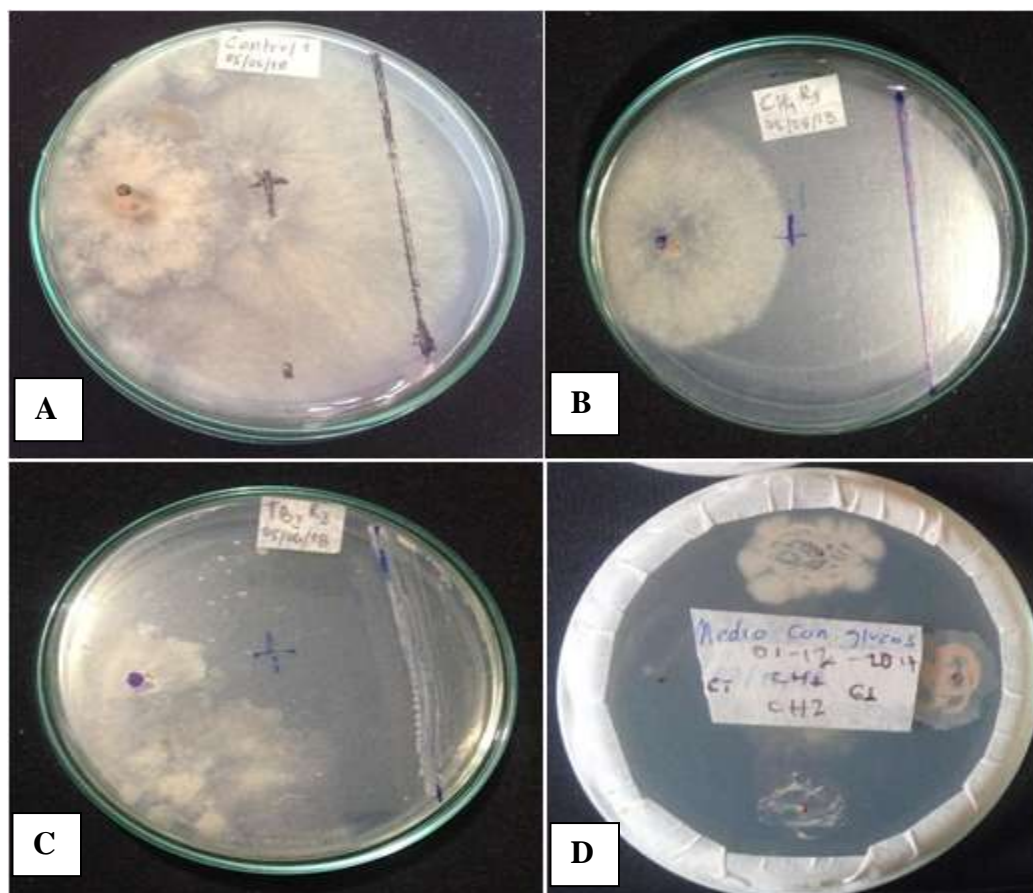


Imagen 19. A: Control (invadido por *Botrytis*); B: Cepa CH1; C: Cepa TB3; D: Crecimiento de cepas CH1, CH2 y G1

Las bacterias que mejor evidenciaron la disminución del crecimiento del hongo o la resistencia de la colonización del agar en el que se desarrollara la cepa bacteriana fueron los morfotipos G1, CH1, CH2, TB1, TB3 (*Imagen 19*).

Los microorganismos tienen diferentes mecanismos para controlar los patógenos y dentro de estos, se pueden destacar la competencia, la antibiosis, la inducción de resistencia, la interacción directa con el patógeno y el microparasitismo. La *competencia* es la lucha de dos especies por un requerimiento de espacio o nutrientes en común, lo cual una de estas hará un mayor uso del requerimiento, limitando el crecimiento de la otra especie, generando así la acción antagonista (Layton, Maldonado, Monroy, Corrales, & Sánchez, 2011). La *antibiosis* es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos (Infante, Martínez, González, & Reyes, 2009) y se caracteriza por la inhibición o destrucción de un microorganismo por los productos metabólicos de otros, que incluyen antibióticos, enzimas líticas y enzimas detoxificadoras (Hernández Rodríguez, Heydrich, Velázquez del Valle, & Hernández Lauzardo, 2006); La *inducción de resistencia* se puede definir como el perfeccionamiento de la capacidad defensiva de la planta a través de la rizosfera, contra un gran número de patógenos (Hernández Rodríguez, Heydrich, Velázquez del Valle, & Hernández Lauzardo, 2006); La *interacción directa con el patógeno* comprende el *parasitismo*, el cual es la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos y consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulasa, β , 1-3 glucanasa y proteasa, que rompen las estructuras de los hongos parasitados (Fernández & Vega, 2001); Por último, otro de los mecanismos que tienen los microorganismos para el control de los patógenos, es el *microparasitismo*, el cual en el artículo de (Infante,

Martínez, González, & Reyes, 2009), publicado en la Revista de Protección Vegetal, está definido como una simbiosis antagónica entre organismos, en la que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa o celulasa, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados. Así mismo se describen las etapas de la *Trichoderma spp.*, en este mecanismo, las cuales son el crecimiento quimiotrófico, el reconocimiento, la adhesión y enrollamiento, y la actividad lítica. Resumiendo las anteriores etapas, se inicia con la localización del hospedante por parte del antagonista, haciendo crecer sus hifas hacia él, posteriormente reconociéndolo mediante interacciones lectinas-carbohidratos y adhiriéndose mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y por ultimo ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista, inhibiendo así el crecimiento del patógeno.

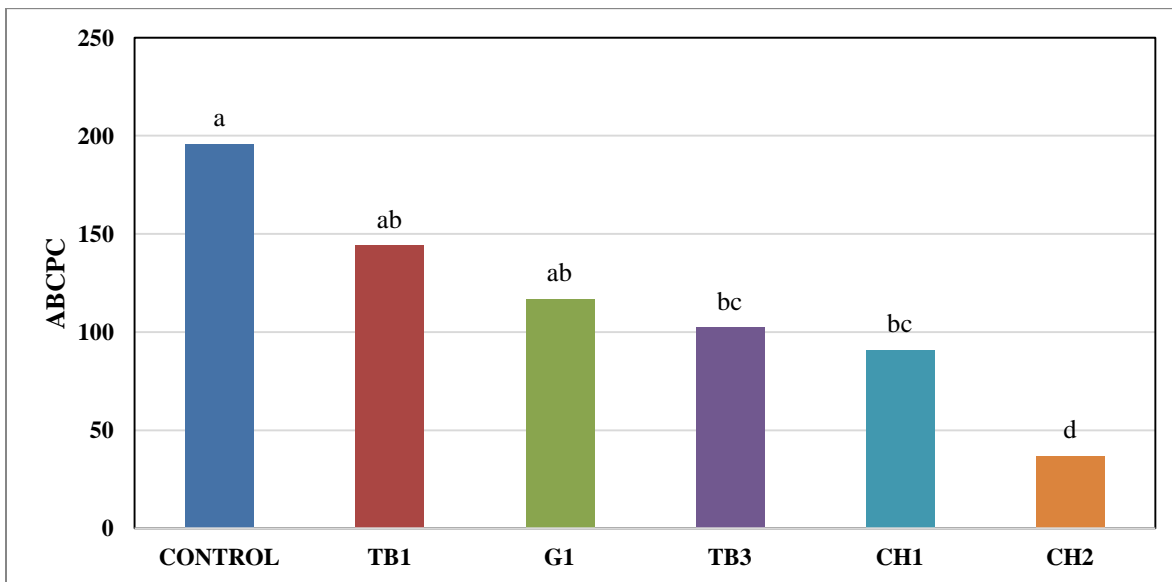
Las bacterias halófilas son productoras de enzimas hidrolíticas extracelulares tales como amilasas, proteasas, lipasas, ADNasas, pululanases, fosfatasas, xilanasas y nucleasas, las cuales poseen diferentes usos en procesos biotecnológicos e industriales. Enzimas como quitinasas y β – 1,3 – glucanasas, son las encargadas de degradar las paredes celulares de los hongos patógenos, siendo factores clave involucrados en la supresión de estos patógenos por agentes de control biológico (Essghaier, *et al.*, 2009).

Posteriormente y de acuerdo a lo anterior, se implementó un ensayo de cuantificación de la capacidad antagónica de las cepas G1, CH1, CH2, TB1 y TB3 en placas de Petri con medio de cultivo solido MEA. En este ensayo se enfrentaron individualmente las bacterias aisladas al crecimiento miceliar de *Botrytis cinérea*. Mediante la medición diaria del diámetro de la colonia

del fitopatógeno, fue posible graficar con los datos recolectados la curva de crecimiento obtenida tras la aplicación de cada uno de los tratamientos (bacterias aisladas).

Gráfico 2

*Área bajo la curva del progreso del crecimiento de *B. cinérea* (ABCPC) en medio de cultivo MEA en presencia de 5 aislamientos de bacterias procedentes de manantiales termales. Las columnas que presentan las mismas letras no presentan diferencias significativa LSD ($p \leq 0.05$)*



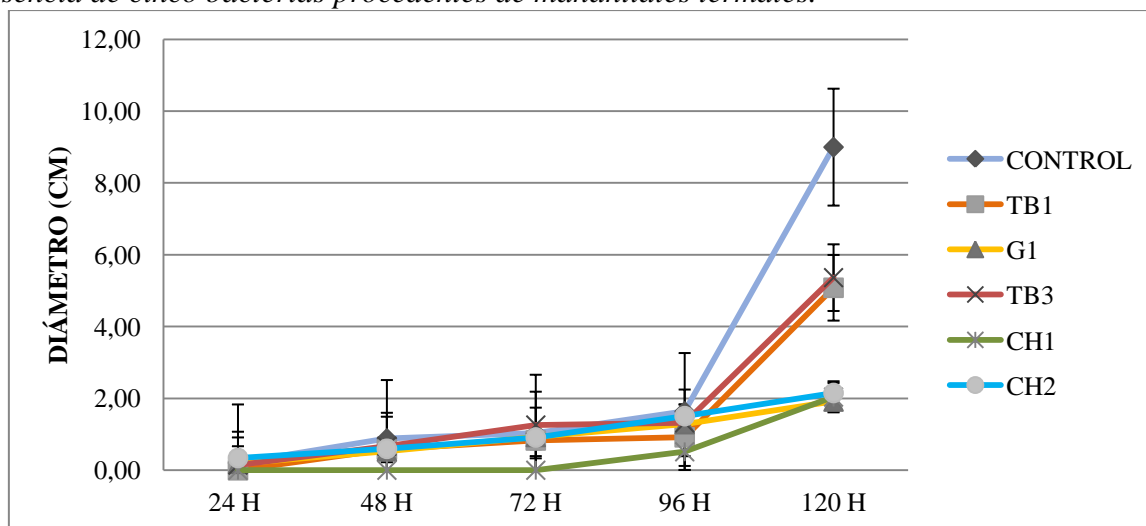
Fuente: Los autores, 2018.

Como parámetro de comparación entre tratamientos, se calculó el área bajo la curva(ABCPC) del crecimiento de la colonia del hongo en presencia de cada una de las cepas y así fue realizada una prueba de ANOVA con un 95% de confianza, con el fin de evidenciar diferencias significativas de los tratamientos con el control (sin tratamiento) (Gráfico 2).

Diámetro de colonia de B. cinérea en presencia de 5 aislamientos de bacterias.

Gráfico 3

Diámetro de colonia de B. cinérea a través del tiempo en medio de cultivo agar MEA en presencia de cinco bacterias procedentes de manantiales termales.



Fuente: Los autores, 2018.

En el *Gráfico 3* se puede observar que el tratamiento control, es decir aquel en el que no se enfrentó a ninguna de las cepas aisladas, tuvo un crecimiento en el que transcurridos 6 días del ensayo colonizó toda la superficie de la caja de Petri tal como se observa en la *Imagen 20*.

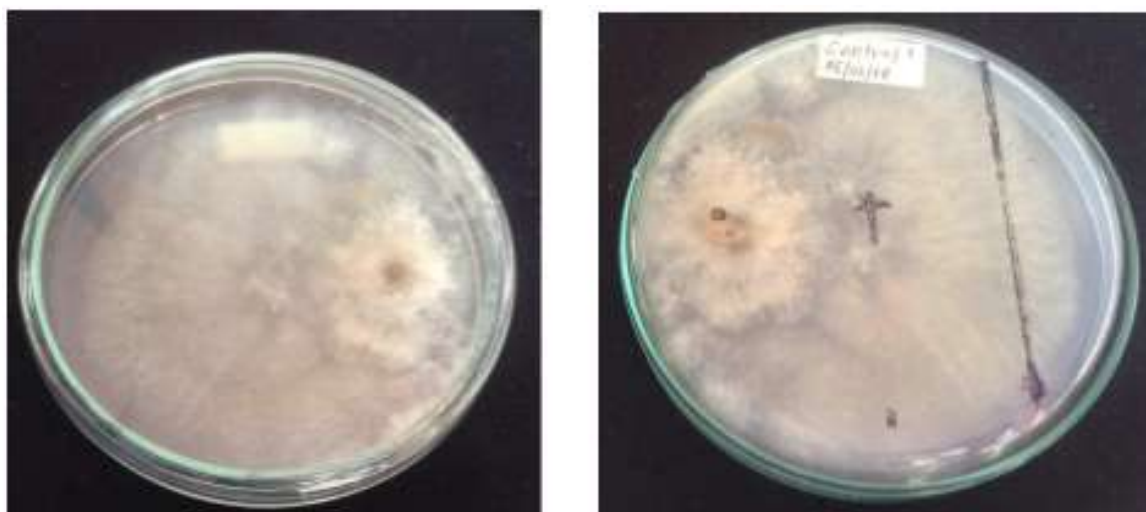


Imagen 20. Crecimiento del hongo Botrytis cinérea en caja de Petri control (sin tratamiento)

Como se observa en el *Gráfico 3*, las 5 cepas evaluadas presentaron la inhibición del crecimiento, en diferentes proporciones, de la colonia de *Botrytis cinérea*. Los aislamientos que presentaron mayor porcentaje de control, fueron las correspondientes a CH1 y G1, tratamientos que presentaron mayores diferencias significativas con el control, al aplicar el análisis de Tukey, que permite hacer una prueba de las medias de las áreas bajo la curva y compararlas entre sí y con el control. Sin embargo la cepa CH1 corresponde a la especie *Bacillus cereus*, la cual según diferentes autores, como por ejemplo (Sánchez, Correa, & Castañeda Sandoval, 2016), la han identificado como una bacteria que puede producir diferentes toxinas que afectan la salud humana cuando se consumen en alimentos contaminados por este microorganismo, produciendo diarrea y vomito; por tal motivo esta bacteria se podría utilizar en otras plantas para el control biológico, pero no en este caso o en otros que se aplicaría directamente en el fruto.

Identificación molecular

Las cepas que presentaron mejores resultados en el control del crecimiento del fitopatógeno en medio de cultivo sólido, fueron enviadas a un laboratorio especializado (corpogen) para su identificación mediante la secuenciación del gen 16s rRNA, las cuales son secuencias genéticas muy conservadas de generación en generación y actualmente es el método más eficiente para la identificación de género y especie en bacterias.

Los resultados de la implementación de los análisis moleculares se presentan en el *Anexo 3*. Análisis molecular CORPOGEN y en la *Tabla 10* a continuación se hace la relación de las bacterias con la codificación implementada en esta investigación y la correspondiente especie que fue determinada mediante la comparación de las secuencias genéticas con las bases de datos.

Tabla 10.*Identificación género y especie de las bacterias con mayor poder antagonista*

Especie	Cepa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TB1
<i>Bacillus subtilis</i> (<i>B. licheniformis</i> , <i>B. sonorencis</i>)	G1
<i>Bacillus subtilis</i>	TB3
<i>Bacillus cereus</i>	CH1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CH2

Nota: Identificación de cepas mediante secuencias genéticas (*Fuente:* Corpogen)

El género *Bacillus* es un agente con gran potencial para el control de enfermedades de origen fúngico, debido posiblemente a que estos microorganismos inducen la resistencia sistemática de las plantas (Reinoso Pozo & otros, 2007), así mismo en el estudio realizado por estos mismos autores, se encontraron resultados positivos con algunas de las bacterias del genero *Bacillus* en el control biológico de hongos fitopatógenos, como el *A. solani* o *R. solani*, los cuales coincidían con otros autores reportados en la literatura.

Por otra parte, en un estudio realizado por (Rojas Badía, Tejera Hernández, Larrea Murrel, Mahillon, & Heydrich Pérez, 2011), donde se realizaron aislamientos de rizobacterias del genero *Bacillus*, a partir de diferentes tipos de suelo; se pudieron obtener varios aislados que posteriormente fueron usados para verificar el poder antagonico de estos microorganismos contra hongos fitopatógenos que afectaban al cultivo de arroz, tales como *Pyricularia grisea*, *Altenaria solani*, *Fusarium sp.* y *Curvularia sp.*; logrando así una efectividad de alrededor del 90% de la inhibición del hongo.

En otro estudio realizado por (Izzeddin A & Medina T, 2011) en el cual investigaron el efecto del control biológico de tres antagonistas microbianos (*Trichoderma viride*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*), sobre fitopatógenos (*Phytophthora spp*, *Fusarium monilliforme* y *Rhizoctonia solani*) causantes de enfermedades en vegetales como: tomate, cebolla y pimentón;

se pudo demostrar que es posible la inhibición de estos hongos y consigo una buena estimulación en la germinación de las semillas y un mayor tamaño de las plántulas.

Ensayo de la capacidad antagónica de las bacterias halladas

Prueba de antagonismo en fresas

Realizadas las pruebas in vitro y vistos los resultados de la posible actividad antagonista de algunas bacterias, se procedió al desarrollo del ensayo en una de las frutas más susceptibles al ataque del hongo *Botrytis cinérea*, la fresa, las cuales se seleccionaron y prepararon debidamente, cortando pequeñas rodajas de aproximadamente 2 a 3 milímetros de espesor, se colocaron por triplicado dentro de cajas plásticas transparentes para visualizar los resultados y aislar de otros microorganismos.



Imagen 21. Ensayo de capacidad antagónica en fresas

Tal como se aprecia en la *Imagen 21*. Tras el análisis de los resultados de la aplicación del ensayo usando este modelo, se evidenciaron dificultades de operación que no permitieron

cuantificar correctamente el parámetro escogido para evidenciar el efecto de antagonismo sobre el hongo fitopatógeno. La fresa es un fruto, que, a pesar de la desinfección empleada con hipoclorito y etanol, es muy sensible a la contaminación bacteriana debido a su manipulación diaria al momento de realizar la medición del diámetro de la colonización por *Botrytis cinérea*. Así, en la mayoría de tratamientos de control biológico implementados en el ensayo no hubo una precisión en las medidas, de tal forma que permitiera desviaciones estándar aceptables para el análisis estadístico de los datos.

En el presente ensayo se implementó una concentración celular de 4×10^8 células/ml, es necesario realizar ensayos para dimensionar la concentración de células más adecuada que evidencie la inhibición de la manifestación signos y síntomas debido a la infección por el hongo patógeno. De igual manera se pueden usar modelos in planta en los que se pueda cuantificar el diámetro de crecimiento del fitopatógeno de mejor forma.

CONCLUSIONES

Se logró obtener microorganismos halófilos moderados y extremos de las aguas termales, con la capacidad antagónica para *Botrytis sp.*, para lo cual primero se enriquecieron en un medio de cultivo básico y suplir así los requerimientos de sal necesarios para su desarrollo; y posteriormente se cultivaron en medio de cultivo LB con concentraciones de 5%, 10% y 20%, siendo esta última concentración de sal en la que mejor crecieron las bacterias

Se caracterizaron e identificaron los microorganismos encontrados, observando que la mayoría de los microorganismos hallados y con posible capacidad antagónica, eran de tipo bacilo.

Se evaluó la capacidad antagónica de los diferentes microorganismos obtenidos de las aguas termales, alcanzando mejores resultados en laboratorio con las cepas G1, TB1, TB3, CH1 y CH2. Aunque según diferentes autores, describen la cepa CH1 como productora de toxinas, lo cual podría contaminar la fruta donde se aplique, desencadenando intoxicación al ser consumida, por tal motivo sería una cepa a descartar, aunque haya generado buenos resultados antagonistas.

Una vez obtenidos los resultados in vitro, se procedió a realizar las pruebas en fresas, lo cual aunque generó algunos resultados positivos, no alcanzó lo esperado.

Se podría decir que el control biológico del hongo *Botrytis cinérea* es posible, de acuerdo a los resultados obtenidos, pero bajo ciertas condiciones de humedad, temperatura y sanidad. Cabe resaltar que el control biológico principalmente es una forma de control preventivo de plagas, antes que curativo, lo que quiere decir que una vez infectado el cultivo con este patógeno, no serviría de nada la aplicación de los microorganismos encontrados en el presente proyecto.

RECOMENDACIONES

Se recomienda que en un futuro se pueda continuar desarrollando este proyecto o similares, partiendo de los resultados obtenidos y así contribuir al control biológico de plagas, de esta manera reduciendo la aplicación de productos químicos y así mismo disminuir los efectos negativos en el medio ambiente.

Ya que todas las pruebas se hicieron en laboratorio, incluso los ensayos *in planta*, es recomendable experimentar directamente en el cultivo con las condiciones reales del ambiente, en diferentes épocas del año y bajo los diferentes factores que puedan afectar el control biológico con los microorganismos obtenidos en el proyecto.

Si se continúan investigaciones relacionadas, es recomendable usar otros medios de cultivo para verificar el desarrollo de los microorganismos y posible mejoramiento en la capacidad antagónica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agustin. (29 de julio de 2011). *Ecologiahoy*. Obtenido de Fungicidas - Antihongos agrícolas:

<https://www.ecologiahoy.com/fungicidas>

Álvarez Barragán, H. A. (2012). *Efecto del Manejo Nutricional del Calcio en la Expresión de*

Botrytis cinérea en Flores y Tallos de Rosa sp. Obtenido de Biblioteca Digital

Universidad Nacional de Colombia:

<http://www.bdigital.unal.edu.co/11274/1/07790775.2012.pdf>

Araujo Salvatierra, E. G. (15 de octubre de 2014). *Enfermedades del tomate*. Obtenido de

Podredumbre seca (fusarium solani):

<http://enfermedadesdeltomate1.blogspot.com/2014/10/podredumbre-seca.html>

Biblioteca Wilson Popenoe de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. (s.f.). *Sanidad*

Vegetal. Patógenos que atacan los cultivos. Obtenido de

<https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1354/2/02.pdf>

Bolda, M., & T. Koike, S. (Julio de 2016). *El Moho Gris o Pudrición de Fresa*. Obtenido de

División de Agricultura y Recursos Naturales. Universidad de California :

<http://ucanr.edu/blogs/fresamora/blogfiles/37849.pdf>

CANNA. (s.f.). *CANNA*. Obtenido de Fusarium - Plagas y Enfermedades:

<http://www.canna.es/fusarium-plagas-enfermedades>

Cano T, M. A. (julio - diciembre de 2013). *Estrategias biológicas para el manejo de*

enfermedades en el cultivo de fresa (Fragaria spp). Obtenido de Revista Colombiana de

ciencias hortícolas - Vol 7 - No. 2 - pp. 263-276:

http://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/2240/2200

CCM Salud. (2013). *CCM Salud*. Obtenido de Antagonismo - definición:

<https://salud.ccm.net/faq/12582-antagonismo-definicion>

Corrales, L. C., Sánchez, L. C., Cuervo, J., Joya, J. A., & Marquez, K. (Enero - Junio de 2012).

Efecto biocontrolador de Bacillus spp., frente a Fusarium sp., bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (Thymus vulgaris L.). Obtenido de Hemeroteca

UNAD: <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/518/998>

Cotes, A. M. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en Colombia. En W. Bettiol,

M. Rivera, P. Mondino, J. Montealegre, & Y. Colmenárez, *Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe* (págs. 169-179). Obtenido de

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1012615/1/2014LV01.pdf>

Cuervo Usán, Y., Espadas Reséndiz, M., & Zita Padilla, G. d. (s.f.). *Fitopatología (Manual de*

Prácticas de Ingeniería Agrícola). Obtenido de Universidad Nacional Autónoma de México:

http://asesorias.cuautitlan2.unam.mx/fondo_editorial/comite_editorial/manuales/Fitopatologia.pdf

Deconceptos.com. (s.f.). *Deconceptos.com*. Obtenido de Concepto de inhibición:

<https://deconceptos.com/general/inhibicion>

Eaton, A. D., Franson, M. A., Association, A. P., Association, A. W., & Federation, W. E.

(2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington: American Public Health Association.

Editorial Definición MX. (07 de julio de 2013). *Editorial Definición MX*. Obtenido de Definición

de Patógeno: <https://definicion.mx/patogeno/>

- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., & Delen, N. (2007). Epidemiology of *Botrytis cinerea* in Orchard and Vine Crops. En E. Philip A, M. Themis J, & S. S. Media (Ed.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (págs. 243 - 272). Netherlands: Springer Science & Business Media.
- Essghaier, B., Fardeau, M., Cayol, J., Hajlaoui, M., Boudabous, A., Jijakli, H., & Sadfi-Zouaoui, N. (2009). Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2008.04053.x>
- FAO - Organización las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2004). *El futuro de la agricultura depende de la biodiversidad*. Obtenido de FAO Sala de Prensa: <http://www.fao.org/newsroom/es/focus/2004/51102/index.html>
- Fernández, D. (20 de julio de 2017). La 'botritis' o el mal de la fresa. Andalucía, España. Obtenido de https://www.eldiario.es/andalucia/lacuadraturadelcirculo/botritis-mal-fresa_6_667093288.html
- Fernández, O., & Vega, L. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo integrado de plagas*, 62, 96 - 100.
- Flores Fernández, M. L., Zavaleta, A. I., & Chávez Hidalgo, E. L. (2010). Bacterias halotolerantes con actividad lipolítica aisladas de las salinas de Pilluana - San Martin. *Ciencia e Investigación*, 13(2), 87 - 91. Obtenido de <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/viewFile/3232/2700>
- Flores, M. L., Zavaleta, A. I., Zambrano, Y., Cervantes, L., & Izaguirre, V. (2010). Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasa de interes biotecnológico. *Ciencia e*

- Investigación*, 13(1), 42 - 46. Obtenido de http://200.62.146.19/BVRevistas/ciencia/v13_n1/pdf/a08v13n1.pdf
- García Gutierrez, C., & Rodríguez Meza, G. D. (septiembre - diciembre de 2012). Problemática y riesgo ambiental por uso de plaguicidas en Sinaloa . *Ra Ximhai - Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, 8(3), 1 - 10. Obtenido de <http://uaim.edu.mx/webraximhai/Ej-25baticulosPDF/1%20GARCIA-GUTIERREZ.pdf>
- García, I. (s.f.). *Botrytis cinérea: un exterminador de cosechas altamente infeccioso - detallado*. Obtenido de Canna: http://www.canna.es/botrytis_cinerea_detallado
- Garzón Rubiano, V. M. (01 de abril de 2016). *Aislamiento e identificación de bacterias halófilas con potencial bioactivo aisladas de las Salinas de Zipaquirá, Colombia*. Obtenido de Intellectum - Unisabana: <http://hdl.handle.net/10818/22883>
- Hernández Rodríguez, A., Heydrich, P. M., Velázquez del Valle, M. G., & Hernández Lauzardo, A. N. (enero - junio de 2006). Perspectivas del Empleo de Rizobacterias Como Agentes de Control Biológico en Cultivos de Importancia Económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 42 - 49. Recuperado el 08 de 08 de 2017, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61224107>
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (enero - abril de 2009). Mecanismos de acción de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal*, 24(1), 14 - 21. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002
- Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. (s.f.). *Subgerencia Protección y Regulación Agrícola*. Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. Obtenido de Restricciones, prohibiciones y

suspensión de registros de plaguicidas de uso agrícola en Colombia :

<https://www.ica.gov.co/getdoc/b2e5ff99-bd80-45e8-aa7a-e55f0b5b42dc/%20PLAGUICIDAS-PROHIBIDOS.aspx>

Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales - IDEAM. (s.f.). *Republica de*

Colombia - Ministerio de Medio Ambiente. Obtenido de Toma y preservacion de

muestras: [http://files.control-ambiental5.webnode.com.co/200000131-](http://files.control-ambiental5.webnode.com.co/200000131-456e54665e/TOMA%20Y%20PRESERVACI%C3%93N%20DE%20MUESTRAS.pdf)

[456e54665e/TOMA%20Y%20PRESERVACI%C3%93N%20DE%20MUESTRAS.pdf](http://files.control-ambiental5.webnode.com.co/200000131-456e54665e/TOMA%20Y%20PRESERVACI%C3%93N%20DE%20MUESTRAS.pdf)

Izzeddin A, N., & Medina T, L. (diciembre de 2011). Efecto del control biológico por

antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus*, 15(3), 8 - 12.

Koppert - Biological Systems. (s.f.). *Koppert - Biological Systems*. Obtenido de Control

biológico: <https://www.koppert.es/control-de-plagas/directrices/biological-control/>

Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales, L. C., & Sánchez, L. C. (10 de Noviembre de

2011). *Bacillus spp. perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en*

cultivos afectados por fitopatógenos. Obtenido de Hemoroteca UNAD:

<http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/501/1061>

Legislación Ambiental. (s.f.). *Legislación Ambiental*. Obtenido de Red por la Justicia Ambiental

en Colombia: <https://justiciaambientalcolombia.org/herramientas-juridicas/legislacion-ambiental/>

López Geta, J. A., Martínez Navarrete, C., Moreno Merino, L., & Navarrete Martínez, P. (1992).

Las agua subterráneas y los plaguicidas. Obtenido de

http://www.igme.es/actividadesigme/lineas/HidroyCA/publica/libros4_CCA/libro28/lib28.htm

March, G. J. (abril de 2014). *Fundación agropecuaria para el desarrollo de Argentina - FADA*.

Obtenido de Agricultura y plaguicidas - un análisis global:

http://fundacionfada.weebly.com/uploads/9/8/5/0/9850131/agricultura_y_plaguicidas._e-book._28.04.14.pdf

Marques Costa, T. M. (Junio de 2013). *Caracterización Fisiológica y Genética de las*

poblaciones naturales de Botrytis cinérea de los viñedos de Castilla y León. Obtenido de

Centro Hispanoluso de Investigaciones Agrarias - CIALE. Universidad de Salamanca:

https://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/123022/1/DMG_martinsmarquescosta_caracterizacionfisiologicageneticapoblacionesnaturalesbotrytiscinerea.pdf

Martínez Villareal, R., Garza Romero, T., Moreno Medina, V., Hernández Delgado, S., &

Mayek Pérez, N. (octubre de 2016). Bases bioquímicas de la tolerancia al estrés osmótico

en hongos fitopatógenos: el caso de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Revista*

Argentina de Microbiología, 48(4), 347-357. Obtenido de

<http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v48n4/v48n4a16.pdf>

Mc Connell, S., Wightwick, A., Smith, T., & Porteous, C. (2003). Code of Environmental Best

Practice for Viticulture – Sunraysia region. *Environmental Best Practices*, 1. Victoria ,

Australia.

Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. (julio de 2010). *Ministerio de*

Ambiente y Desarrollo Sostenible de la República de Colombia. Obtenido de Plan

Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo sobre COP - Republica de Colombia:

<http://quimicos.minambiente.gov.co/index.php/contaminantes-organicos-persistentes/la-convencion-de-estocolmo/plan-nacional-de-aplicacion>

Nava Pérez, E., García Gutiérrez, C., Camacho Báez, J. R., & Vázquez Montoya, E. L.

(septiembre - diciembre de 2012). Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai - Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, 8(3), 17 - 29. Obtenido de <http://uaim.edu.mx/webraximhai/Ej-25barticulosPDF/3%20NAVA-PEREZ.pdf>

Nicholls Estrada, C. I. (2008). *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*. Medellín: Universidad de Antioquia .

Ramírez, J. A., & Lacasaña, M. (2001). *Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición*. Obtenido de uniciencia: <http://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Placlausotoxmedexpmx.pdf>

Ramírez, N., Sandoval, A., & Serrano, J. (enero de 2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1 - 2), 12 - 23. Obtenido de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1315-25562004000100004&script=sci_arttext

Real Academia de Ingeniería. (s.f.). *Real Academia de Ingeniería*. Obtenido de [diccionario.raing.es: http://diccionario.raing.es/es/lema/plaguicida](http://diccionario.raing.es/es/lema/plaguicida)

Real Academia de Ingeniería. (s.f.). *Real Academia de Ingeniería*. Obtenido de Cepa bacteriana: <http://diccionario.raing.es/es/lema/cepa-bacteriana>

Real Academia de Ingeniería. (s.f.). *Real Academia de Ingeniería*. Obtenido de Espectrofotómetro: http://diccionario.raing.es/es/lemas?title=espectrofotometro&title_op=contains&tid=All

Real Academia Española. (2017). *Diccionario de la lengua española*. Obtenido de Real Academia Española: <http://dle.rae.es/?id=8HccZ0a>

Real Academia Española. (2017). *Diccionario de la Lengua Española* . Obtenido de Inhibición : <http://dle.rae.es/?id=Lbcq9E8>

Real Academia Española. (2017). *Real Academia Española - Diccionario de la Lengua Española*. Obtenido de Antagonismo: <http://dle.rae.es/srv/fetch?id=2lQ9OJo>

Reinoso Pozo, Y., Vaillant Flores, D., Casadesús Romero, L., García Pérez , E., & Pazos Álvarez Rivera, V. (marzo de 2007). SELECCIÓN DE CEPAS DE BACILLUS Y OTROS GÉNEROS RELACIONADOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE HONGOS FITOPATÓGENOS. *Fitosanidad*, 11(1), 35 - 40. Recuperado el 06 de 08 de 2017, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209116144007>

Riccioppo, R. D. (noviembre de 2011). *Agroquímicos: Sus efectos en la población - Medidas de prevención*. Obtenido de Colegio de Médicos de la Provincia de Buenos Aires, Distrito VII Pehuajo - Colmed7: <http://www.colmed7.org.ar/files/Trabajos/AGROQUIMICOS.pdf>

Rojas Badía, M. M., Tejera Hernández, B., Larrea Murrel, J. A., Mahillon, J., & Heydrich Pérez, M. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de Bacillus asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de Agroecologia*, 6(1), 90 - 99. Obtenido de http://orgprints.org/23097/1/Bad%C3%ADa_Aislamiento.pdf

Rubio, S. A., Alfonso , A. M., Grijalba, C. M., & Pérez, M. M. (enero - junio de 2014).

Determinación de los costos de producción de la fresa cultivada a campo abierto y bajo

macrotúnel. *REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS*, 8(1), 67 - 79.

Recuperado el 07 de 08 de 2017, de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v8n1/v8n1a07.pdf>

Sánchez, J., Correa, M., & Castañeda Sandoval, L. M. (mayo - agosto de 2016). *Bacillus cereus* un patógeno muy importante en el control microbiológico de los alimentos. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 34(2), 230 - 242. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v34n2/v34n2a12.pdf>

Sanhueza Del Valle, G. (2012). *Determinación de resistencia de diez aislamientos de Botrytis cinérea Pers. ex Fr., obtenidos de frutos de arándano (Vaccinium corymbosum L.), a cinco fungicidas*. Obtenido de Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias - Escuela de Agronomía: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/fas226d/doc/fas226d.pdf>

Santiago, R., Huiliñir, C., Cottet, L., & Castillo, A. (11 de octubre de 2016). Microbiological characterization for a new wild strain of *Paenibacillus polymyxa* with antifungal activity against *Botrytis cinérea*. *Elsevier- Biological Control*, 103, 251 - 260. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964416301839>

Soto Deza, N. M., López Medina, S. E., & Murguía Reyes, C. A. (enero - junio de 2012). *Eficacia de la cepa nativa de Bacillus subtilis como agente supresor del nematodo del nudo Meloidogyne spp. en cultivo de Capsicum annuum (ají pimiento piquillo)*. Recuperado el octubre de 2017, de Revista de Investigación Agraria y Ambiental. Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD: <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/931/931>

Tejera Hernández, B., Rojas Badía, M., & Heydrich Pérez, M. (septiembre - diciembre de 2011).

Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138.

Obtenido de <http://www.redalyc.org/html/1812/181222321004/>

UdeSantiago al día - Universidad de Santiago de Chile. (7 de mayo de 2015). *Noticias*

Universidad de Santiago de Chile. Obtenido de Investigadores desarrollan biofungicida para combatir hongo que afecta a la uva: <http://www.usach.cl/news/investigadores-desarrollan-biofungicida-para-combatir-hongo-afecta-la-uva>

Universidad Nacional Autónoma de México - Departamento de Microbiología y Parasitología. (9

de diciembre de 2016). *Glosario de Microbiología y Parasitología*. Obtenido de

Universidad Nacional Autónoma de México - Departamento de Microbiología y Parasitología: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/glosario.html>

Velázquez del Valle, M. G., Bautista Baños, S., Hernández Lauzardo, A. N., Gerra Sánchez, M.

G., & Amora Lazcano, E. (enero de 2008). Estrategias de Control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, Agente Causal de Pudriciones Postcosecha en Productos

Agrícolas. *Revista Mexicana de fitopatología*, 26(1), 49-55. Obtenido de

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092008000100008&lng=es&tlng=es

Villa Martínez, A., Pérez Leal, R., Morales Morales, H. A., Basurto Sotelo, M., Soto Parra, J.

M., & Martínez Escudero, E. (abril - junio de 2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta*

Agronómica, 64(2), 194-205. Obtenido de <https://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>

- Villaamil Lepori, E. C., Bovi Mitre, G., & Nassetta, M. (Septiembre de 2013). Situación actual de la contaminación por plaguicidas en Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*(29), 25 - 43. Obtenido de <http://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/41476/38388>
- Villarreal Sánchez, A. E. (27 de agosto de 2013). *Identificar microorganismos con base a técnicas bacteriológicas* . Obtenido de blogspot: <http://cbtisespiroquetas155.blogspot.com/2013/08/>
- Villota Meza, T. D. (2014). *Biorremediación de aguas residuales con alta salinidad mediante bacterias halófilas aisladas de perfiles costeros de Ecuador*. Obtenido de Repositorio Digital Universidad De Las Américas: <http://200.24.220.94/bitstream/33000/2274/1/UDLA-EC-TIAM-2014-05.pdf>
- Viñuela, E. (2005). La lucha biológica, pieza clave de la agricultura sostenible . En J. Jacas, P. Caballero, & J. Ávila, *El control biológico de plagas y enfermedades* (págs. 15-30). Castelló de la Plana: Publicacions de la Universitat Jaume I. 2005.
- Wightwick, A., Walters, R., Allinson, G., Reichman, S., & Menzies, N. (2010). *Environmental Risks of Fungicides Used in Horticultural Production Systems*. IntechOpen. Obtenido de <https://www.intechopen.com/books/fungicides/environmental-risks-of-fungicides-used-in-horticultural-production-systems>

ANEXOS

Anexo 1. Marco legal sobre plaguicidas

Tabla 11
Marco legal sobre plaguicidas

NORMA	DESCRIPCIÓN
Decreto 2811 de 1974 – Presidencia de la Republica	Por el cual se dicta el Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente
Resolución 447 de 1974 – Ministerio de Agricultura	Prohíbe el uso y venta de Insecticidas Clorados con destino al cultivo del tabaco: Aldrin, BHC, Clordano, DDD, DDT, Dieldrin, Endrin, Heptacloro, Heptacloro Epóxido, isobenzan, Melipax y Toxapheno
Resolución 2189 de 1974 – ICA	Cancela los registros de los productos fungicidas de uso agrícola producidos a base de compuestos de Mercurio
Resolución 1042 de 1977 – ICA	Cancela los registros de venta de plaguicidas a base de Leptophos (PHOSVEL)
Resolución 209 de 1978 – Ministerio de Agricultura	Prohíbe el uso de Plaguicidas Organoclorados en el cultivo del cafeto.
Resolución 749 de 1979 – ICA	Cancela los registros de venta de los productos herbicidas a base de 2, 4, 5-T y 2, 4, 5-TP
Resolución 243 de 1982 – ICA	Prohíbe la producción, importación, y venta de los plaguicidas a base de Dibromocloropropano (DBCP), utilizados en el control de plagas del suelo
Resolución 1158 de 1985 – ICA	Prohíbe la importación, producción y venta de los plaguicidas de uso agrícola que contengan el ingrediente activo Dibromuro de Etileno (EBD)
Resolución 1849 de 1985 – ICA	Prohíbe la importación, producción y venta de los insecticidas de uso agrícola que contengan el ingrediente activo Endrin
Decreto 704 de 1986 – Presidencia de la Republica	Prohíbe el uso del DDT, sus derivados y compuestos a menos que se empleen en la ejecución de programas o campañas adelantadas o autorizadas por el Ministerio de Salud
Resolución 891 de 1986 – ICA	Cancela dos licencias de venta de productos que incluyen en su formulación el compuesto denominado DDT
Resolución 366 de 1987 y 531, 540, 723, 724 y 874 de 1988 – ICA	Cancelan las Licencias de Venta de los insecticidas Organoclorados que contengan los ingredientes activos: Aldrin, Heptacloro, Dieldrin, Clordano y Canfecloro en su composición
Resolución 19408 de 1987 – Ministerio de Salud	Prohíbe el uso y manejo de los plaguicidas a base de Clordimeform y sus sales
Decreto 305 de 1988 –	Prohíbe la importación, producción y formulación de los

Presidencia de la Republica	productos Organoclorados: Aldrin, Heptacloro, Dieldrin, Clordano y Canfecloro y sus compuestos. Se exceptúa temporalmente Dieldrin y Clordano para uso en madera y queda vigente temporalmente para Canfecloro la licencia que permite su presentación en la mezcla Toxafeno más Metil Paration en su formulación ultra bajo volumen
Resolución 47 de 1988 – ICA	Cancela las licencias de venta de los plaguicidas que contienen Clordimeform en su composición
Resolución 3028 de 1989 –ICA	Prohíbe la aplicación por vía aérea en el territorio nacional de los herbicidas que contienen el Ingrediente Activo PARAQUAT
Resolución 4863 de 1989 – ICA	Cancela licencia de venta correspondiente al fungicida de uso agrícola denominado Dithane M-22 (Maneb)
Resolución 5052 de 1989 – ICA	Cancela licencias de venta a los plaguicidas de uso agrícola denominados Manzate D y Manzate
Resolución 5053 de 1989 – ICA	Prohíbe la importación, producción y venta de plaguicidas de uso agrícola que contengan en su composición el ingrediente activo Captafol y cancela las licencias de venta correspondientes
Resolución 2308 de 1990 – ICA	Prohíbe la importación, producción, venta y aplicación en el territorio nacional de los fungicidas en uso agrícola que contengan el ingrediente activo Terbuconazol Todas las personas tienen derecho a gozar de un ambiente sano. La ley garantizará la participación de la comunidad en las decisiones que puedan afectarlo. Es deber del Estado proteger la diversidad e integridad del ambiente, conservar las áreas de especial importancia ecológica y fomentar la educación para el logro de estos fines
Artículo 79 Constitución Política de 1991	Queda prohibida la fabricación, importación, posesión y uso de armas químicas, biológicas y nucleares, así como la introducción al territorio nacional de residuos nucleares y desechos tóxicos. El Estado regulará el ingreso al país y la salida de él de los recursos genéticos, y su utilización, de acuerdo con el interés nacional
Constitución Política 1991 artículo 81	
Decreto 1843 de 1991 – Presidencia de la Republica	Por el cual se reglamentan parcialmente los títulos III, V, VI, VII y XI de la ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas
Resoluciones 2156, 2157, 2158, 2159 Y 3501 DE 1991	Cancela las Licencias de Venta de los insecticidas a base de LINDANO, bajo la formulación de polvos mojables y concentrados emulsionables
Resolución 10834 de 1992 – Ministerio de salud	Todo plaguicida que se utilice en el país deberá obtener concepto previo favorable de clasificación toxicológica y permiso de uso del Ministerio de Salud o su autoridad delegada
Resolución 29 de 1992 – ICA	Prohíbe el uso de insecticidas para uso agrícola a base de Fonofos
Resolución 9913 de 1993 – Ministerio de Salud	Prohíbe la importación, producción, formulación, comercialización, manejo, uso y aplicación de los Fungicidas Maneb, Zineb y sus compuestos relacionados
Ley 55 de 1993	Por medio de la cual se aprueba el "Convenio No. 170 y la


	Recomendación número 177 sobre la Seguridad en la Utilización de los Productos Químicos en el trabajo", adoptados por la 77a. Reunión de la Conferencia General de la O.I.T., Ginebra, 1990
Ley 101 de 1993 – Congreso de Colombia	Ley General de Desarrollo Agropecuario y Pesquero
Resolución 10255 de 1993 – Ministerio de Salud	Prohíbe la importación, producción, formulación, comercialización, uso y manejo de los siguientes productos: DIELDRIN, CLORDANO, DODECACLORO o MIREX, PENTACLORO FENOL, DICOFOL, DDT, BHC HEPTACLORO LINDANO y sus compuestos relacionados, y se exceptúan temporalmente de esta prohibición, el LINDANO formulado para uso como ECTOPARASITICIDA en salud humana, hasta tanto el Ministerios de Salud determine que hay sustitutos eficaces en esta aplicación y el ENDOSULFAN hasta tanto se disponga de evidencia técnica de un sustituto de eficacia comparable contra el <i>hypotenemus hampei</i>
Decreto 1840 de 1994 – Presidencia de la Republica	Se designa al ICA para que, entre otras actividades, ejerza el control y vigilancia epidemiológica en el uso y manejo de plaguicidas que ayuden a prevenir efectos nocivos en la salud, sanidad ambiental y vegetal, y el establecimiento de controles, tales como el concepto toxicológico y permiso de uso, que debe otorgar el Ministerio de la Protección Social, y la Licencia de Venta que expide el ICA
Ley 170 de 1994 – Congreso de Colombia	En esta norma se consagran medidas relacionadas con sustancias tóxicas y plaguicidas con las cuales se busca proteger la vida y la salud de las personas y de los animales, pues promueven la evaluación del riesgo y pretenden determinar el nivel adecuado de protección sanitaria o fitosanitaria
Resolución 923 de 1994 – ICA	Cancela la Licencia de Venta No. 1648 correspondiente al producto MIRMEX SB, cuyo titular es la firma MINAGRO LIMITADA. por contener DODECACLORO
Resolución 924 de 1994 – ICA	Cancela la Licencia de Venta No. 1657 correspondiente al producto AGRONEXIT 2.5 SUFLO y que contiene en su composición el ingrediente activo LINDANO
Resolución 925 de 1994 – ICA	Cancela la Licencia de Venta No. 1717 correspondiente al producto LINDAFOR 2.5 DP, por contener LINDANO
Resolución 926 de 1994 – ICA	Cancela la Licencia de Venta No. 1205, 1980 y 1465 correspondientes a los productos GORGORICIDA AGRICENSE, LEXAGRO, 10% AGRICENSE Y LEXAGRO 3% AGRICENSE, por contener en su composición el ingrediente activo LINDANO
Resolución 927 de 1994 – ICA	Cancela la Licencia de Venta No. 1948 correspondiente al producto MIRENEX GB, por contener DODECACLORO
Resolución 928 de 1994 – ICA	Cancela la Licencia de Venta No. 1204 correspondiente al producto KELTHANE 35. por contener DICOFOL
Resolución 929 de 1994 –	Cancela la Licencia de Venta No. 1666 correspondiente al

ICA	producto BRAVO WP, por contener Maneb y Zineb.
Resolución 930 de 1994 – ICA	Cancela la Licencia de Venta No. 0608 correspondiente al producto BRESTAN 60 WP, por contener Maneb y zineb
Resolución 931 de 1994 – ICA	Cancela la Licencia de Venta No. 1773 correspondiente al producto LINDANO “ALMAGRÍCOLA” 2.5% SUELO, por contener Lindano
Resolución 3079 de 1995 – ICA	Por la cual se dictan disposiciones sobre la industria, comercio y aplicación de bioinsumos y productos afines, de abonos o fertilizantes, enmiendas, acondicionadores del suelo y productos afines; plaguicidas químicos, reguladores fisiológicos, coadyuvantes de uso agrícola y productos afines
Ley 253 de 1996 – Congreso de Colombia	Por medio de la cual se aprueba el Convenio de Basilea sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación
Resolución 4166 de 1997 – Ministerio de Salud	Prohíbe la importación, fabricación, formulación, comercialización y uso de los productos plaguicidas con base en Lindano, solo o en combinación con otras sustancias químicas
Ley 430 de 1998 – Congreso de Colombia	Por la cual se dictan normas prohibitivas en materia ambiental, referentes a los desechos peligrosos y se dictan otras disposiciones
Resolución 058 del 2002 - MAVDT	Por la cual se establecen normas y límites máximos permisibles de emisión para incineradores y hornos crematorios de residuos sólidos y líquidos
Decisión Andina 436 de 1998 Decreto 502 de 2003 – MADR	Por el cual se reglamenta la Decisión Andina 436 de 1998 para el registro y control de plaguicidas químicos de uso agrícola
Convenio de Estocolmo. El 17 de mayo de 2004	Entro en vigencia, con el objetivo de proteger la salud humana y el medio ambiente frente a los COP mediante la adopción de medidas de control para producción, importación, exportación, uso y eliminación de estas sustancias
Decreto 1443 de 2004 – Presidencia de la Republica	Tiene por objeto el establecimiento de medidas ambientales para el manejo de los plaguicidas, y para la prevención y control de la contaminación ambiental por el manejo de plaguicidas y desechos o residuos peligrosos provenientes de los mismos, con el fin de proteger la salud humana y el medio ambiente
Decreto 4741 de 2005 – Presidencia de la Republica	Por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y el manejo de los residuos o desechos peligrosos generados en el marco de la gestión integral
Convenio de Rotterdam Ley 1159 de 2007	Por medio de la cual se aprueba el “Convenio de Rotterdam para la Aplicación del Procedimiento de Consentimiento Fundamentado previo a ciertos Plaguicidas y Productos Químicos Peligrosos, Objeto de Comercio Internacional”
Resolución 693 de 2007 – MAVDT	Por la cual se establecen criterios y requisitos que deben ser considerados para los Planes de Gestión de Devolución de Productos Posconsumo de Plaguicidas
Ley 1196 de 2008	Por medio de la cual se aprueba el “Convenio de Estocolmo

	sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes”
Decreto 727 de 2012 – Presidencia de la Republica	Por el cual se modifica el artículo 5° del Decreto número 502 de 2003
Resolución 6 de 2015 – Consejo Nacional de estupefacientes	Por la cual se ordena la suspensión del uso del herbicida glifosato en las operaciones de erradicación de cultivos ilícitos mediante aspersión aérea
Decreto 1071 de 2015 – Presidencia de la Republica	Por medio del cual se expide el Decreto Único Reglamentario del Sector Administrativo Agropecuario, Pesquero y de Desarrollo Rural

Anexo 2. Análisis fisicoquímicos del agua

Análisis de agua Choachí

ANALISIS DE AGUA		<i>Identificación del documento</i>	
No. Laboratorio 10785		FAD-16	
		VERSIÓN	1
Propietario:	Universidad Santo Tomas	Fecha de Muestreo	2017-10-05
Dirección:	Cra 9 No. 72 - 50	Fecha de Recepción	2017-10-06
Ciudad:	Bogota	Fecha de Análisis	2017-10-17
		Orden de Trabajo No.	59654
Información de la Muestra			
Finca	Destino del Agua	Características	
Metamora	Consumo Humano	Líquido incoloro	
Municipio	Origen	Identificación	
CHOACHI	CUN Sin especificar	Volcanes de Choachí	
Análisis Organoléptico			
Sabor:	Aceptable		
Olor:	Aceptable		
Prohibida la copia total o parcial del presente informe. Toda copia autorizada deberá llevar este sello en original en cada una de sus páginas. Los presentes resultados analíticos corresponden exclusivamente a la muestra recibida en el Laboratorio y no a otros materiales de la misma procedencia.			
		Pag. 1/1	
		Fin del informe.	

Felipe Calderón Sáenz
Director General; T.P. 3186

Katherine Jurado Bello
Jefe de Laboratorio

ANÁLISIS de AGUAS

Propietario

Universidad Santo Tomas

Dirección:

Cra 9 No. 72 - 50

Ciudad:

Bogota

Fecha de Análisis

2017-10-17

No. Laboratorio

10785

Fecha de Muestreo

2017-10-05

Fecha de Recepción

2017-10-06

Destino del Agua

Consumo Humano

Origen del Agua

Sin especificar

Otros Datos

Liquido incoloro

Municipio

CHOACHÍ

Finca

Metamorfa

Fuente

Volcanes de Choachi

Sodio:	mg/L	66.24
Potasio:	mg/L	8.19
Calcio:	mg/L	52.71
Magnesio:	mg/L	11.19
Amonio:	mg/L	0.72
Cloro Residual	mg/L<	0.10
Suma Cat; meq/lt		6.68
N-NO2	mg/L<	0.10
Hierro:	mg/L	0.09
Manganeso:	mg/L	0.19
Cobre:	mg/L	0.01
Zinc:	mg/L	0.01
Boro:	mg/L	0.09
Fluoruros	mg/L	0.68
TDS	mg/L	504.00
Dureza Total(CaCO3)	mg/L	142.00

Cloruros: mg/L 55.38

Sulfatos: mg/L 23.52

Carbonatos: mg/L <0.05

Bicarbonatos: mg/L 277.55

NO3: mg/L 9.30

Fosfatos: mg/L 33.25

Suma An. meq/lt 7.15

Alcalinidad mg/L 270.00

pH: 8.23

C.E.: mS / cm 0.72

Color: UPC 5.00

Turbidez: NTU <0.10

C.O.T. mg/L 23.50

Orden de Trabajo: 59854

Asistente Técnico
Dr. Calderón Labs.

Análisis de agua Tabio

INFORME

No. Laboratorio 10824

Identificación del documento

FAD-16

VERSIÓN

1

Propietario:	Universidad Santo Tomas
Dirección:	Cra 9 No. 72 - 50
Ciudad:	Bogota
Matriz:	Agua

Fecha de Muestreo:	2017-11-02
Fecha de Recepción:	2017-11-02
Fecha de Análisis:	2017-11-14

Orden de Trabajo No.

60089

Información de la Muestra

Destino del Agua	Fuente	Características
Ambiental	Sin especificar	Líquido Incoloro
Municipio	Identificación	
TABIO	CUN	Ternales el Zipa

RESULTADOS DEL ANALISIS

Parámetro	Reporte	Unidades	Metodos Analíticos
**DQO:	45.78	mg/L O2	Reflujo Cerrado y Colorimétrico SM 5220D
DBO5:	< 1	mg/L O2	LBC 23 Respirometría
**Sólidos Suspendidos Totales:	19.00	mg/L	Gravimetría - SM 2540D

Prohibida la copia total o parcial del presente informe. Toda copia autorizada deberá llevar este sello en original en cada una de sus páginas. Los presentes resultados analíticos corresponden exclusivamente a la muestra recibida en el Laboratorio y no a otros materiales de la misma procedencia.



Pag. 1/2

Felipe Calderón Sáenz
Director General; T.P. 3188

Juan Camillo Amezquita
Microbiólogo

INFORME

No. Laboratorio 10824

Identificación del documento

FAD-16

VERSIÓN 1

Propietario:	Universidad Santo Tomas
Dirección:	Cra 9 No. 72 - 50
Ciudad:	Bogota
Matriz:	Agua

Fecha de Muestreo:	2017-11-02
Fecha de Recepción:	2017-11-02
Fecha de Análisis:	2017-11-14
Orden de Trabajo No.	60089

Información de la Muestra

Destino del Agua	Fuente	Características
Ambiental	Sin especificar	Líquido Incoloro
Municipio	Identificación	
TABIO	CUN	Temales el Zipa

RESULTADOS DEL ANALISIS

Parámetro	Reporte	Unidades
Conductividad Eléctrica:	2.7	ms/cm
pH:	7.95	
Turbidez:	0.1	NTU
Oxígeno Disuelto (21.6°C):	2.2	mg/L O2
Color:	5	HAZEN (UPC)
TDS:	1890	mg/L
N-NO3:	1.9	mg/L
Fosfatos:	15.12	mg/L
Azufre:	1.04	mg/L

Prohibida la copia total o parcial del presente informe. Toda copia autorizada deberá llevar este sello en original en cada una de sus páginas. Los presentes resultados analíticos corresponden exclusivamente a la muestra recibida en el Laboratorio y no a otros materiales de la misma procedencia.



Pag. 2/2

Fin del Informe.



Laboratorio acreditado por el IDEAM para los parámetros marcados con ** según Resolución N° 0310 del 09 de Marzo de 2016

Felipe Calderón Sáenz
Director General; T.P. 3188

Katherine Jurado Bello
Jefe de Laboratorio

Anexo 3. Análisis molecular CORPOGEN

Código CORPOGEN	Especie	CEPA	Tratamientos % SAL	6 horas			24 horas			Observaciones
				R1	R2	R3	R1	R2	R3	
65-2	Bacillus cereus	CH1	0	0,66	0,27	0,17	0,52	0,48	0,51	Potencialmente Patógena, pero se ha utilizado en CB con inductor de resistencia (aplicar en hojas).
			5	0,19	0,11	0,07	0,18	0,42	0,20	
			10	0,08	0,04	0,04	0,11	0,10	0,14	
			20	0,05	0,01	0,02	0,02	0,03	0,01	
65-4	Staphylococcus epidermidis	CH2	0	0,16	0,15	0,16	0,45	0,41	0,38	Patógena oportunista, se utilizado en CB en la rizosfera
			5	0,14	0,14	0,15	0,24	0,23	0,33	
			10	0,11	0,12		0,13	0,19		
			20	0,07	0,06	0,05	0,12	0,12	0,12	
65-3	Pseudomonas aeruginosa	TB1	0	0,26	0,25	0,24	0,42	0,31	0,32	Antecedentes de control biológico.
			5	0,09	0,09		0,13	0,13	0,15	
			10	0,02	0,01	0,07	0,12	0,13	0,14	
			20	0,02	0,03		0,03	0,02	0,01	
65-5	GRUPO Bacillus subtilis (B. licheniformis, B. sonorensis)	TB3	0	0,12	0,11	0,09	0,10	0,13	0,15	Antecedentes de control biológico.
			5	0,10	0,15	0,15	0,04	0,03	0,08	
			10	0,05	0,05	0,04	0,15	0,15	0,09	
			20	0,03	0,03		0,04	0,03		
65-6	GRUPO Bacillus subtilis (B. licheniformis, B. sonorensis)	G1	0	1,07	1,01	1,01	1,01	1,05	1,56	Antecedentes de control biológico.
			5	0,31	0,43	0,53	0,53	0,78	0,64	
			10	0,33	0,34	0,53	0,53	0,51	0,49	
			20	0,05	0,03	0,22	0,22	0,31	0,27	